



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL – UFERSA/UFRN

**ANÁLISE TOXICOLÓGICA, CITOTÓXICA E  
MUTAGÊNICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Aspidosperma  
pyrifolium* (APOCYNACEAE)**

**EDIGLEYCE DE LIMA COSTA**

MOSSORÓ/RN – BRASIL  
Fevereiro/2015

EDIGLEYCE DE LIMA COSTA

**ANÁLISE TOXICOLÓGICA, CITOTÓXICA E  
MUTAGÊNICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Aspidosperma  
pyrifolium* (APOCYNACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Nobrega de Sousa

MOSSORÓ/RN – BRASIL  
Fevereiro/2015

Catálogo na Fonte

Catálogo de Publicação na Fonte. UFERSA - BIBLIOTECA CENTRAL ORLANDO  
TEIXEIRA - CAMPUS MOSSORÓ

Costa, Edigleyce De Lima.

Análise toxicológica, citotóxica e mutagênica de extratos  
aquosos de *Aspidosperma pyrifolium* apocynaceae/ Edigleyce  
De Lima Costa. – Mossoró, 2015.

74f: il.

1. Plantas da caatinga 2. *Allium cepa*. 3. Micronúcleo. I. Título.

RN/UFERSA/BCOT/410

CDD 581.981 L732a

EDIGLEYCE DE LIMA COSTA

**ANÁLISE TOXICOLÓGICA, CITOTÓXICA E  
MUTAGÊNICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Aspidosperma  
pyrifolium* (APOCYNACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semiárido – UFRSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

APROVADA EM: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Marcos Antonio Nobrega de Sousa  
Presidente – Orientador – PPGPA/UFRSA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Liz Carolina da Silva Lago Cortes Assis  
Primeiro Membro – Interno – PPGPA/UFRSA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva  
Segundo Membro – Externo – DCAN/UFRSA

Aos meus pais, que sempre apoiaram os meus sonhos e que são o motivo de eu ter chegado até aqui. Amo vocês.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

(Marthin Luther King)

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sua graça, proteção e misericórdia, por ter me dado ânimo e perseverança para chegar até aqui. Tu és a razão do meu existir e todos os meus passos e sonhos são direcionados por ti, e estão entregues em suas mãos. Guia-me sempre, meu Senhor.

Aos meus pais, Ednilson Rodrigues da Costa, grande batalhador, e Maria Marlinda de Lima Costa, posso dizer que é uma guerreira, que são os meus maiores encorajadores nessa jornada. Por acreditarem em mim. Por terem tido a paciência para me aconselharem e confiarem que tudo ia dar certo. Agradeço por suas orações, pelo apoio, amor, carinho e incentivo. Amo vocês.

Ao meu noivo, Railton Rômulo, que tanto me apoiou e ouviu minhas lamúrias, enxugou minhas lágrimas, me aconselhou quando eu estava desanimada, sempre segurando minha mão dizendo que tudo ia dar certo. Ele com certeza foi parte dessa dissertação, foi quem virou noites comigo me ajudando, mesmo não sendo obrigação dele, mas ele fez isso por mim. Ele é meu amigo, meu confidente, meu namorado, meu noivo, meu príncipe... amor lindo. Com certeza, um presente de Deus na minha vida. Te amo.

A Dona Rosinha, irmão Ramilton e filhos, essa família que Deus me deu, obrigada por suas orações e todo carinho dedicado a minha pessoa;

A todos meus familiares, avôs, avós, tios, tias, primos, primas, vizinhos da minha terra natal, amigos distantes, que sempre torceram por minha vitória, de modo que evito citar nomes para que nenhum possa ser colocado de fora;

As meninas do ap. 804. Vocês foram presentes de Deus na minha vida, irmãs que nunca tive. Cada uma com suas características especiais, Thaís Kazimoto, com sua bondade; Maressa Sousa, com seu gênio forte, mas que nada impediu de nos aproximarmos mais e mais; Rute, a palhaça da casa; Maraísa, com o “sou daqui, daqui ninguém me tira” kkkk. Tenho carinho imenso por vocês, esses dois anos de convivência me proporcionou um aprendizado todo diferenciado, e tenho certeza que consegui amadurecer em alguns aspectos da minha vida. Sei que não sou perfeita, mas obrigada Thaís pelos conselhos, pelos choques de realidade, te admiro. Maressa, acredito que nossas gargalhadas não vão acabar tão cedo. Rute, “tá querendo”. Quatro gênios totalmente diferentes, mas que deram tão certo. Amo vocês.

Aos amigos...são tantos. Mas vamos lá! Maressa, além de colega de apartamento, se tornou uma amiga toda especial. Somos diferentes, sim, como somos. E como essa amizade deu certo? Deus que proporcionou. Muitas gargalhadas, muitos estresses, muitas noites viradas, muitoss tantas coisas, né, Maressa? Mas agradeço a Deus por sua amizade, oro e intercedo por muitos aspectos da sua vida, se é que você me entende kkkk E o dia vai chegar que você chegará pra mim e dirá, “nossa, deu tudo certo Edigleyce”. Thaísa, veixe, o que dizer de Thaísa? Irmã, amiga, companheira, intercedora. Você chegou de mansinho na minha vida, e ganhou um lugar todo especial no meu coração. Seu jeito humilde, sua fonte inesgotável, mas eu sei que posso contar sempre com você. És sim, uma amiga mais chegada que irmão, porque foi uma amizade dada por Deus. Espero está presente também em várias realizações dos seus sonhos, e espero que esteja comigo também nas realizações

dos meus sonhos. Madrinhas, não tem como fingir ou fugir. Esse trio junto, só Deus na causa. Amo vocês. É difícil falar de todos amigos, minha dissertação seria só isso. Mas quero agradecer aqueles que com certeza também são especiais para mim, Priscyla Figueiredo, Willyanne Figueiredo, Maria Luiza, Lídia, Jordana, Liziane, tantos outros!

A José Carlos, obrigada pela imensa ajuda. Eterno núcleo. Deus possa recompensar tudo o que fizeste.

Aos meus amigos Naama e Eliezer, que lutaram juntamente comigo para que esse trabalho fosse realizado. Muitos estresses rolaram, mas faz parte. Se não estivéssemos juntos, nada disso teria acontecido. Agradeço a vocês por tudo.

A todos do LAGENE, e a eterna lageniana Mayra Pinheiro, nossa nova médica. Você também teve uma contribuição bem significativa nesse trabalho, obrigada por toda ajuda, e por me tirar do apertado. Felicidade nessa nova jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Antonio Nobrega de Sousa, por toda orientação, paciência, incentivo, conselhos, que só vieram acrescentar este trabalho, além de toda compreensão, dedicação e por toda competência. São seis anos de convivência, de modo que agradeço por tudo professor, te admiro muito. Espero que quando eu for professora (tenho fé kkk), eu tenha 10% da paciência que o senhor teve conosco.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Liz Carolina da Silva Lago Cortes Assis e Prof<sup>a</sup>. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva, bem como ao Prof. Dr. Carlos Campos Camara, por toda ajuda e cooperação neste trabalho.

A todos com quem me relacionei nesta etapa da minha vida, período que me acrescentou muito em experiência;

A Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal, bem como seus professores, por ter me concedido espaço e subsídios para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indireta, permitindo-me chegar à conclusão do mestrado.

Obrigada!

COSTA, EDIGLEYCE DE LIMA. ANÁLISE TOXICOLÓGICA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Aspidosperma pyrifolium* (APOCYNACEAE). 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal: Caracterização, Conservação e Melhoramento Genético de Recursos Locais) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró – RN, 2015.

**RESUMO** A espécie *Aspidosperma pyrifolium* Mart. é utilizada na alimentação por animais de produção. No entanto, são escassos os estudos sobre a toxicidade dessa planta. Este trabalho objetivou identificar a existência de efeito tóxico, citotóxico e mutagênico de folhas de *A. pyrifolium* no sistema teste *Allium cepa* e em camundongos. Foi feita a análise de crescimento de raízes, inibição relativa e índice mitótico com o teste *Allium cepa*. Para a DL50 foram utilizados grupos de camundongos, observados por 14 dias para determinar a quantidade de mortos, doentes e sobreviventes. Para o teste de micronúcleo e células binucleadas foi feita a extração da medula óssea dos animais. Os bioensaios com o *Allium cepa* realizados revelaram que o extrato aquoso das folhas secas não mostrou efeito tóxico, contudo, estimulou a divisão celular na concentração de 50 mg/L, sendo indicativo de formação de células tumorais. As folhas frescas foram tóxicas na concentração de 300 mg/L e teve efeito tóxico subletal na concentração de 5 mg/L. Nos camundongos, a dose letal mediana foi de 750,63 mg/Kg com o extrato aquoso de folhas frescas, sendo letal nas concentrações testadas a partir da concentração de 900 mg/Kg em machos e fêmeas. Os animais avaliados apresentaram alterações comportamentais no sistema nervoso e alteração no peso médio total. As concentrações testadas indicaram não serem mutagênicas e nem citotóxicas na análise geral das frequências de micronúcleo e células binucleadas, respectivamente. Mas, este trabalho fornece dados de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade ainda não investigados para a espécie *A. pyrifolium*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Allium cepa*. Índice Mitótico. *Mus musculus*. Dose letal mediana. Micronúcleo. Célula Binucleada.

COSTA, EDIGLEYCE DE LIMA. ANALYSIS TOXICOLOGICAL, CYTOTOXIC AND MUTAGENIC EXTRACTS AQUEOUS *Aspidosperma pyrifolium* (APOCYNACEAE). 2015. 74 f. Master Science Degree in Animal Science: Characterization, Conservation and Breeding Local Resources) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoro – RN, 2015.

**ABSTRACT:** The *Aspidosperma pyrifolium* Mart species. it is used in feed for farm animals. However, there are few studies on the toxicity of this plant. This study aimed to identify the existence of toxic effect, cytotoxic and mutagenic leaves of *A. pyrifolium* the test system *Allium cepa* and mice. It was made growth analysis of roots, inhibition relative and mitotic index with the *Allium cepa* test. For the LD50 they were used of groups mice were observed for 14 days to determine the number of dead and surviving animals. For the micronucleus test and binucleated cells was done extracting bone marrow of animals. Bioassays performed with the *Allium cepa* revealed that the aqueous extract of dried leaves showed no toxic effects, however, stimulated cell division in a concentration of 50 mg/L, is indicative of formation of tumor cells. The fresh leaves were toxic at the concentration of 300 mg/L and had a effect toxic sublethal on concentration of 5 mg/L.. In mice, the median lethal dose was 750.63 mg/kg with the aqueous extract of fresh leaves, and lethal concentrations tested from the concentration 900 mg/kg in males and females. The evaluated animals showed behavioral changes in the nervous system and change in average total weight. The concentrations tested indicated are not mutagenic or not cytotoxic in the overall analysis of micronucleus frequency and binucleated cells, respectively. But, this work provides data toxicity; cytotoxicity and mutagenicity still have not investigated for the species *A. pyrifolium*.

**KEYWORDS:** *Allium cepa*. Mitotic Index. *Mus musculus*. Median Lethal Dose. Micronucleus. Cell Binucleated.

## LISTA DE TABELAS

### Cap. II.

**Tabela 1.** Crescimento médio (mm) e inibição relativa de raízes de bulbo de *Allium cepa* L. expostas ao extrato aquoso das folhas secas (EAS) e frescas (EAF) de *Aspidosperma pyrifolium*. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* ( $p < 0,05$ ) diferença significativa entre as concentrações e o controle. Método de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's..... 43

**Tabela 2.** Total de células, células em mitose observadas ao microscópio, valores do índice mitótico (%), fases da mitose e limite de citotoxicidade (%) de células de raiz de *Allium cepa* após a exposição ao extrato aquoso de folhas secas (EAS) e frescas (EAF) de *Aspidosperma pyrifolium*. Método de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's. .... 46

### Cap. III.

**Tabela 1.** Número de mortes a partir da administração intraperitoneal em doses crescentes do extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium*. na: número de animais utilizados em cada nível de dose. .... 60

**Tabela 2.** Peso médio (g)  $\pm$  desvio padrão das fêmeas, dos machos e do total de animais (machos+fêmeas) que receberam o extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium*. Foi empregado o método de Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. .... 63

**Tabela 3.** Micronúcleos e células binucleadas (média  $\pm$  desvio padrão) em células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal do extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium*. Método de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's. .... 65

## LISTA DE FIGURAS

### Considerações Gerais

**Figura 1.** Representação esquemática da formação de micronúcleos como consequência de uma lesão no material genético de uma célula em divisão. (a) Origem de um micronúcleo a partir de um cromossomo inteiro e fragmentos cromossômicos acêntricos na anáfase; (b) formação de uma ponte a partir de cromossomos dicêntricos, onde os centrômeros se dirigem para os lados opostos da célula (Fonte: Adaptada de FENECH, 2000). ..... 17

**Figura 2.** Esfregaço de medula óssea de camundongos com: (A) eritrócitos normocromáticos (ENCs); (B) eritrócito policromático (EPC) e (C) eritrócito policromático micronucleado (EPCMN) (Fonte: Adaptada de MAVOURNIN et al.,1990). ..... 18

### Cap. I.

**Figura 1.** Mapa demonstrando os Estados que o Bioma Caatinga abrange (Fonte: 9)..... 28

**Figura 2.** Planta adulta do pereiro (Fonte: 11). ..... 31

**Figura 3.** A-E) *Aspidosperma pyrifolium*. A e B) Árvores. C) Flor. D e E) Vagens. F) Feto de ovelha intoxicada por *A. Pyrifolium* (Fonte: 20). ..... 33

### Cap. II.

**Figura 1.** Células de cebola em mitose. A= prófase, B= metáfase, C= anáfase, D= telófase. Fonte: Edigleyce Costa..... 45

### Cap. III.

**Figura 1.** Dose letal mediana do extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium* administrados intraperitonealmente em camundongos. Regressão linear da dose-resposta:  $R^2= 0,7498$  e  $Y= 0,06661 * X$ . ..... 60

**Figura 2.** Camundongo sob efeito da concentração de 900 mg/Kg do extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium* apresentando feridas no corpo a partir do 7º dia do screening hipocrático. Foto: Edigleyce Costa. .... 62

**Figura 3.** Análise fatorial da Interação entre o peso médio das fêmeas e machos nas concentrações do controle (0 mg/L), 5 mg/Kg, 50 mg/Kg, 300 mg/Kg, 600 mg/Kg e 900 mg/Kg. .... 64

**Figura 4.** Fotomicrografias (aumento de 1000 x) de MN (A) e células BN (B) encontradas em medula óssea de camundongos após 24 h de administração intraperitoneal do extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium*. Fonte: Edigleyce Costa..... 65

## SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	14
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	14
2. TOXICIDADE AGUDA.....	15
3. GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE .....	15
3.1. Teste <i>Allium cepa</i> .....	16
3.2. Teste de Micronúcleos .....	17
3.3. Anormalidades Nucleares .....	19
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CAPÍTULO I – Intoxicações Naturais e Experimentais em <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart. (Pereiro).....	23
1 INTRODUÇÃO .....	26
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3 O BIOMA CAATINGA.....	27
4 PLANTAS TÓXICAS VERSUS PRODUÇÃO ANIMAL .....	29
5 ESPÉCIE <i>Aspidosperma pyrifolium</i> .....	30
6 INTOXICAÇÕES NATURAIS COM <i>Aspidosperma pyrifolium</i> .....	32
7 INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>Aspidosperma pyrifolium</i> .....	33
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO II – Avaliação da Toxicidade e Citotoxicidade de <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart. com o Teste <i>Allium cepa</i> .....	37
1 INTRODUÇÃO .....	40
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
4 CONCLUSÕES .....	47
5 REFERÊNCIAS .....	48
CAPÍTULO III - Toxicidade Aguda e Efeitos Citotóxicos e Mutagênicos do Extrato Aquoso de Folhas de <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart. em <i>Mus musculus</i> .....	53
1. INTRODUÇÃO .....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	59
4. CONCLUSÕES .....	66
5. REFERÊNCIAS.....	67
6. ANEXOS .....	73

# CONSIDERAÇÕES GERAIS

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A região Nordeste do Brasil abriga no ecossistema da Caatinga um bioma com uma grande diversidade de plantas medicinais, aromáticas e com grande potencial de produção de forragem, constituindo na maioria das vezes a principal fonte de alimentação animal para bovinos, equinos, ovinos e caprinos na região semiárida (PINTO; CAVALCANTE; ANDRADE, 2006). No entanto, apesar do potencial dessa vegetação, muitas dessas plantas consumidas pelos animais são tóxicas, contudo, devido ao período de estiagem, tornam-se opção para a alimentação dos animais (SILVA et al, 2006; ASSIS et al., 2009; RIET-CORREA, BEZERRA E MEDEIROS, 2011; NETO, SAKAMOTO, SOTO-BLANCO, 2013, MEDEIROS et al., 2004; FERREIRA, 2014).

Alguns autores já descreveram algumas plantas que causam efeitos tóxicos aos animais na região nordestina, segundo conhecimento popular dos produtores. Silva *et al.* (2006) investigaram plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. Neto, Sakamoto e Soto-Blanco (2013) realizaram um inquérito epidemiológico de plantas tóxicas da mesorregião Central e Oeste do Rio Grande do Norte. Pimentel (2012) aborda um levantamento de plantas tóxicas do Nordeste Baiano.

Uma das plantas apontadas como tóxicas, através de conhecimento popular, é a espécie *Aspidosperma pyriformium*, conhecida popularmente como pereiro. A espécie tem causado abortos ou nascimentos de animais débeis que morrem após o parto, tanto para bovinos, quanto para caprinos e ovinos. Outro sinal da intoxicação por essa planta é a ocorrência de rigidez dos membros posteriores dos animais, causando dificuldade de locomoção em bovinos, muares e equinos. A época de maior ocorrência de ambas as formas de intoxicação é na caída das folhas, no início do período de estiagem (SILVA et al., 2006).

Neto, Sakamoto e Soto-Blanco (2013) também observaram que a *Aspidosperma pyriformium* causou malformações (flexura dos membros pélvicos, prognatia, braquignatia, microftalmia, dermatoide ocular e atresia anal) em bovinos e caprinos.

No entanto, apesar da identificação pelos produtores de que essa planta é tóxica aos animais, os estudos experimentais que visam comprovar sua toxicidade ainda são escassos, bem como, estudos citotóxicos e mutagênicos.

## **2. TOXICIDADE AGUDA**

Os estudos toxicológicos quando aplicados em animais de laboratório e, sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias ou plantas tóxicas para humanos ou animais expostos às mesmas (BARROS; DAVINO, 2003). A avaliação toxicológica é realizada com ensaios biológicos em animais e os resultados são extrapolados para humanos e animais. Nestes casos, os exames hematológicos, bioquímicos, a autópsia geral, a histopatologia e a manutenção do grupo controle para fins de comparação também podem ser realizados, bem como a avaliação do estado geral dos animais e a observação dos efeitos tóxicos (LIMA; OLIVEIRA; NAGEM, 2003).

A avaliação toxicológica em organismos vivos pode envolver a avaliação dos efeitos obtidos após 24 horas da administração (toxicidade aguda) ou após administrações em doses repetidas (toxicidade subcrônica e crônica) (GOMES, 2011).

A avaliação de toxicidade aguda tem por objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da DL50 (dose letal mediana). Este parâmetro é útil para se identificar a toxicidade relativa da substância frente a uma população animais de experimentação (BARROS; DAVINO, 2003), fornecendo subsídios a cerca dos riscos à saúde, resultantes de uma exposição de curta duração (BRITO, 1994).

## **3. GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE**

A genotoxicidade é um termo geral que se refere a alterações na estrutura geral ou na disposição dos cromossomos, ou nas sequências de pares de bases do DNA por exposição a agentes tóxicos (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Os agentes genotóxicos causam diversos tipos de danos ao material genético, devido às interações químicas. Pode ocorrer formação de adutos, alterações oxidativas e até mesmo quebras no DNA. Mas devido aos sistemas de reparo das células, as lesões, na maioria dos casos, são reparadas ou eliminadas. Se a lesão permanecer e passar para as células filhas, o agente causador da lesão será caracterizado como mutagênico (MÍDIO; MARTINS, 2000).

Assim, é possível concluir que os efeitos genotóxicos podem ser transitórios, enquanto os mutagênicos são aqueles que persistem pelas gerações de células filhas. Logo, a mutagenicidade representa uma alteração permanente no material genético de um organismo (DEARFIELD *et al.*, 2002).

Dentre os métodos disponíveis para avaliar a toxicidade, citotoxicidade e mutagênese de plantas tóxicas, destacam-se o ensaio em *Allium cepa* (cebola) e o teste de micronúcleo em células da medula óssea de roedores (MARSIGLIA et al., 2011).

### **3.1. Teste *Allium cepa***

O sistema teste vegetal de *A. cepa* é um excelente bioindicador para o primeiro *screening* da toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade de plantas consideradas tóxicas, devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de toxicidade, auxiliando os estudos de prevenção de danos à saúde humana e animal (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Este teste permite analisar parâmetros macroscópicos como alteração de cor, formato, tamanho da raiz e deformidade, e ainda microscópicos, como aberrações cromossômicas, índice mitótico (IM) e micronúcleos (MN) (LONGHIN, 2008).

O parâmetro macroscópico mais comumente analisado para a fitotoxicidade é a observação da inibição do crescimento da raiz ou a não germinação de sementes, quando expostas a um composto tóxico (BENASSI, 2004).

Um dos parâmetros microscópicos é o índice mitótico. De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), a análise do Índice Mitótico (IM) foi utilizada em diferentes estudos e a maioria deles mostrou resultados satisfatórios para as análises propostas. O IM constitui um parâmetro importante para a avaliação da toxicidade celular, pois a citotoxicidade pode ser determinada pelo aumento ou pela diminuição do IM.

Índices mitóticos maiores que o controle negativo são resultado de um aumento na divisão celular, que pode ser prejudicial para as células, levando a uma proliferação celular desordenada e até mesmo para a formação de tecidos tumorais. Já a redução significativa do IM em relação ao controle negativo pode indicar alterações, derivadas da ação tóxica de compostos, como por exemplo, compostos alopáticos em plantas tóxicas, sobre o crescimento e desenvolvimento do organismo exposto (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Conforme Turkoglu (2008), a redução do IM pode ser devida a uma inibição da síntese do DNA ou a um bloqueio da Fase G<sub>2</sub> do ciclo celular, impedindo que a célula entre em mitose.

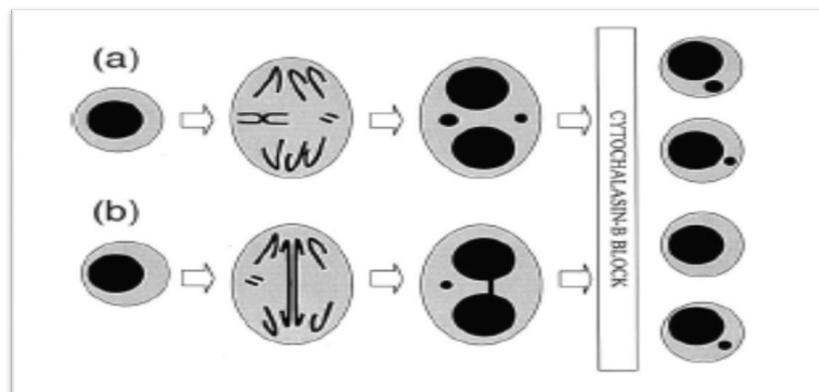
O teste *A. cepa* tem mostrado alta sensibilidade e boa correlação quando comparado com outros sistemas de teste, como por exemplo os testes linfócitos humanos (FISKESJÖ,

1985). Rank e Nielsen (1994) relataram uma correlação de 82% entre o teste *A. cepa* e os testes de carcinogenicidade em roedores.

### 3.2. Teste de Micronúcleos

Entre os testes citogenéticos existentes, o teste do micronúcleo (MN) é comumente usado para avaliar aberrações cromossômicas estruturais e numéricas, induzidas por agentes clastogênicos e aneugênicos (HEDDLE *et al.*, 1991). É uma das técnicas mais promissoras, baratas e rápidas para a avaliação genotoxicológica (HEDDLE *et al.*, 1983).

Os micronúcleos são massas de cromatina com aparência de um pequeno núcleo, resultantes de cromossomos que não migraram para os polos durante anáfase, ou de fragmentos cromossômicos acêntricos (SCHMID, 1976). Os danos no centrômero ou defeitos na citocinese causam o retardamento de fragmentos de cromossomos, ou cromossomos inteiros durante a divisão celular (HEDDLE *et al.*, 1991). Assim, os fragmentos não incorporados permanecem no citoplasma, formando as pequenas quantidades de DNA que constituem os micronúcleos (SCHMID, 1975) (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática da formação de micronúcleos como consequência de uma lesão no material genético de uma célula em divisão. (a) Origem de um micronúcleo a partir de um cromossomo inteiro e fragmentos cromossômicos acêntricos na anáfase; (b) formação de uma ponte a partir de cromossomos dicêntricos, onde os centrômeros se dirigem para os lados opostos da célula (Fonte: Adaptada de FENECH, 2000).

Os micronúcleos podem aparecer em células vegetais, hepatócitos, espermátides de mamíferos, ou seja, o surgimento do micronúcleo ocorre em diversos tipos celulares (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

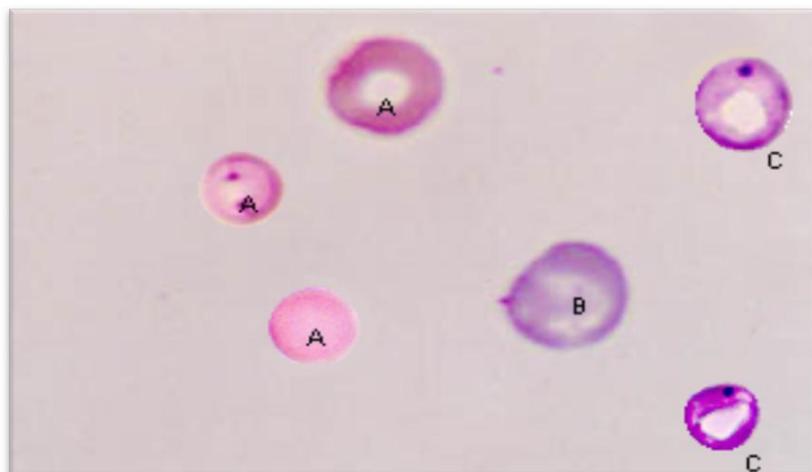
Alguns critérios devem ser avaliados para a correta classificação e determinação da frequência de micronúcleos (MN), incluindo: o diâmetro do MN, que deve ser menor que um

terço do núcleo; o MN não deve ser refratário; a coloração do MN não deve ser mais escura que a do núcleo; e o micronúcleo não deve tocar o núcleo (DA CRUZ *et al.*, 1994).

O teste de MN em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte de uma bateria de testes recomendados para se estabelecer avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos, que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001), e também auxilia na identificação de plantas tóxicas. Este teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos, porém também é realizado em ratos (SOUZA *et al.*, 2006).

A análise de frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de medula óssea de mamíferos foi estabelecida, na década de 70, por Schmid e, ainda hoje, é um dos testes mais utilizados como padrão de aberrações cromossômicas em eucariotos. Os eritrócitos são células abundantes na medula óssea e no sangue periférico de mamíferos. São particularmente propícios ao teste de micronúcleos pela sua alta rotatividade, ausência de núcleo e possibilidade de diferenciar eritrócitos jovens pela presença de RNA (WILD, 1978).

O eritrócito recém-formado contém RNA ribossomal, responsável pela síntese das hemoglobinas. Devido a isso, pode ser corado diferencialmente com um corante para ácidos nucleicos, como por exemplo, o corante Giemsa. As células são desta forma, denominadas de eritrócitos policromáticos (EPC). Este tipo celular jovem pode permanecer estável por mais ou menos 24 horas após a expulsão do núcleo nas células dos mamíferos. Já os eritrócitos maduros são denominados de normocromáticos (ENC), por apresentarem mais hemoglobina (Figura 2) (SALAMONE; HEDDLE, 1983; MAVOURNIN *et al.*,1990; HAYASHI *et al.*, 1994).



**Figura 2.** Esfregaço de medula óssea de camundongos com: (A) eritrócitos normocromáticos (ENCs); (B) eritrócito policromático (EPC) e (C) eritrócito policromático micronucleado (EPCMNs) (Fonte: Adaptada de MAVOURNIN *et al.*,1990).

### 3.3. Anormalidades Nucleares

Ao realizar análises de micronúcleos, alguns pesquisadores perceberam a existência de outras anormalidades nucleares, sugerindo que estas devam ser reportadas em seus resultados. Tais anormalidades representam, além da própria genotoxicidade e mutagenicidade, os erros que ocorrem durante a mitose ou meiose, como também os processos de morte celular (necrose e apoptose) (FENECH *et al.*, 1999).

Alguns autores sugerem que essas anomalias devem ser contabilizadas concomitantemente à análise de micronúcleos. Entretanto, não há um consenso sobre o tipo de irregularidades da morfologia nuclear que podem ser consideradas análogas ao micronúcleo, isto é, resultantes da ação de um agente mutagênico, uma vez que os mecanismos da formação de tais lesões ainda não estão totalmente esclarecidos (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; ÇAVAS; ERGENEGÖZÜKARA, 2003).

Uma dessas anomalias é a formação de células binucleadas, de modo que estas são indicativas de citotoxicidade decorrentes de uma falha no processo de citocinese (HOLLAND *et al.* 2008). O aumento na sua incidência pode prever uma falha no mecanismo de diferenciação celular ou ser secundária a agentes genotóxicos. Os processos subjacentes ao aparecimento dessas anormalidades não são ainda totalmente compreendidos (BASU *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2002; CELIK *et al.*, 2003; REVAZOVA *et al.*, 2011).

## 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, p. 121-135, 1995.

ASSIS, T. S.; MEDEIROS, R. M. T.; ARAÚJO, J. A. S.; DANTAS, A. F. M., RIET-CORREA, F. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.11, p. 919-924, 2009.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: as assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, v. 467, p. 177-186, 2000

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de Allium cepa como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 444-447, 2007.

BARROS, S. B.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J.A. O. (Org.). **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-68.

BASU, A. et al., Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India, **Mutation Research**, v.516, p.29–40, 2002.

BENASSI, J.C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana**. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

BRITO, A.S. **Manual de Ensaios Toxicológicos *in vivo***. Campina, SP: Editora da UNICAMP, 1994.

CARVALHO, M. B. et al. Relation ship between the outcome and the frequency of micronuclei in cells of patients with oral and oropharyngeal carcinoma, **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, p. 317–322, 2002.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**. v. 538, p.81-91, 2003.

CELIK, A. et al. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis** v.18, p. 417-421, 2003.

CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. In, CHOY, W. N. (ed) **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 93–113.

DA CRUZ, A. D., et al. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiânia (Brazil) radiological accident. **Mutation Research**, v. 313, p. 57-68, 1994.

DEARFIELD, K. L., et al. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v. 521, p. 121-135, 2002.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique, **Mutation Research** v. 455, p. 81- 95, 2000.

FENECH, M., et al. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 14, n. 6, p. 605-612, 1999.

FERREIRA, F. W. S. **Levantamento da vegetação da caatinga utilizada na alimentação animal no oeste potiguar**. 2014. 64f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró. 2014.

FISKESJÖ, G. The *Allium test* as standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Landskrona, Suécia, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

GOMES, L. F. S.G. **Abordagem fitoquímica, determinação da atividade antiplasmódica *in vitro* e avaliação preliminar da toxicidade do extrato hidroetanólico das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth (Apocynaceae).** 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará, Belém. 2011.

HAYASHI M. et al. *In vivo* rodent erythrocyte Micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 312, p. 293-304, 1994.

HEDDLE, J. A., et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, p. 277-291, 1991.

HEDDLE, J. A., et al. The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. **Mutation Research** v. 123, p. 61-118, 1983.

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research**, v. 659, p. 93-108, 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring, a review on its application. **Mutation Research** v. 682, p. 71-81. 2009.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Revista de Nutrição**, v. 16, n.3, p.305-314, 2003.

LONGHIN, S. R. **Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos.** 2008. 154 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

MARSIGLIA, J. D.C., et al. Avaliação dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Solanum cordifolium* Dunal e *Solanum torvum* Sw. **Natureza on line**, v.9, n.1, p.30-34. 2011.

MAVOURNIN, K. H., et al. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 239, n. 1, p. 29-80. 1990.

MÍDIO, A; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos.** São Paulo: Varela, 2000. 295p.

NETO, S. A. G.; SAKAMOTO, S. M.; SOTO-BLANCO, B. Inquérito epidemiológico sobre plantas tóxicas das mesoregiões Central e Oeste do Rio Grande do Norte. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 43, n. 7, p. 1281-1287, 2013.

PIMENTEL, L. A. **Plantas tóxicas do Norte Baiano.** 2012. 51 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Campina Grande, Patos – PB, 2012.

PINTO, M. S. C.; CAVALCANTE, M. A. B.; ANDRADE, M. V. M. Potencial forrageiro da caatinga, fenologia, métodos de avaliação da área foliar e o efeito do déficit hídrico sobre o crescimento de plantas. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**, v.7, n. 4, p. 1-11, 2006.

- RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. L. R.; MONTELONE-NETO, R. Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e Critérios de Avaliação. **Revista Brasileira de Genética**, p.83-89, 1991.
- RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the *Allium* anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, v.312, p.17–24, 1994.
- REVAZOVA, J., et al. **Plantas tóxicas do Nordeste**. Sociedade Vicente Pallotti Editora. 2011. 79 p.
- RIET-CORREA, F.; BEZERRA, C. W. C.; MEDEIROS, R. M. T. **Plantas tóxicas do Nordeste**. Sociedade Vicente Pallotti Editora. Universidade Federal de Campina Grande, Patos – PB. 2011. 79 p.
- SALAMONE, M. F.; HEDDLE, J. A. The Bone Marrow Micronucleus Assay: Rationale for a Revised Protocol. **Chemical Mutagens**, v. 8, p. 111-149, 1983.
- SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: HOLLAENDER, A. (Ed.). **Chemical mutagens: principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, 1976, v. 4, p. 31-53.
- SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: Principles and Methods for Their Detection (Hollanender, A., ed.). **Plenum Press**, New York, v. 4, p. 31-53, 1975.
- SILVA, D. M., et al. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 223-236. 2006.
- SOUZA, A. B. et al. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 380-383, 2006.
- TURKOGU, S. et al. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology** p.1-7, 2008.
- WILD, D. Cytogenetic effects in the mouse of 17 chemical mutagens and carcinogens evaluated by micronucleus test. **Mutation Research**, v. 56, p. 319-327, 1978.

**CAPÍTULO I** – Intoxicações Naturais e Experimentais em *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Pereiro).

Trabalho de revisão publicado na revista:  
Revista Saúde & Ciência on line  
Página eletrônica:  
<http://www.ufcg.edu.br/revistasaudeeciencia/index.php/RSC-UFCG/index>  
ISSN: 2317-8469

## INTOXICAÇÕES NATURAIS E EXPERIMENTAIS EM *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (PEREIRO)

Marcos Antonio Nobrega de Sousa<sup>1\*</sup>; Edigleyce de Lima Costa<sup>2</sup>, Naama Jéssica de Assis Melo<sup>2</sup>, Eliezer Fernandes da Silva Filho<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Docente Doutor. Departamento de Ciências Animais – DCAn. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). \*Correspondência: Avenida Francisco Mota, 572. Bairro Costa e Silva. Mossoró/RN. CEP: 59.625-900. E-mail: [marcossousa@ufersa.edu.br](mailto:marcossousa@ufersa.edu.br)

<sup>2</sup> Biotecnologistas, discentes do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

### RESUMO

A espécie *Aspidosperma pyrifolium* Mart. popularmente conhecida como pereiro tem ampla dispersão em toda a zona de savana, sendo geralmente encontrada no Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Paraíba. Esta espécie tem sido indicada por vários produtores como sendo tóxica para os animais. O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão de literatura sobre intoxicações naturais e experimentais com *Aspidosperma pyrifolium*. Para isso, foram realizadas pesquisas em LILACS, SciELO, Google Acadêmico, Jornal da CAPES, PubMed e livros sobre a toxicidade. Observou-se que os estudos têm sido significativos, tanto naturais quanto experimentais, para demonstrar que a toxicidade causa alterações significativas diretas (aborto, malformação, nascimento de animais fracos) aumentando o custo da produção de animais. No entanto, não existem estudos que mostram possíveis modificações genéticas causadas pela espécie.

**Descritores:** Revisão, Toxicidade, Caatinga, Pereiro.

## **INTOXICATIONS NATURAL AND EXPERIMENTAL IN *Aspidosperma pyriforme* Mart. (PEREIRO)**

### **ABSTRACT**

The *Aspidosperma pyriforme* Mart species, popularly known as pereiro has wide dispersion across the savannah zone, being generally found in Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco and Paraíba. The toxic potential of this species has been shown in the scientific literature. The aim of this study was to review the literature on natural and experimental poisoning with *Aspidosperma pyriforme*. For this reason, research in LILACS, SciELO, Google Scholar, Journal of CAPES, PubMed and books about toxicity were performed. It was observed that studies have been significant toxicity to demonstrate that the direct cause significant changes (abortion, malformation, birth of weak animals) increasing the cost of production animals. However, there are no studies showing possible genetic changes caused by species.

**Keywords:** *Review*, toxicity, Caatinga, pereiro.

## 1 INTRODUÇÃO

A região Nordeste do Brasil abriga em seu ecossistema, predominantemente a Caatinga, bioma com uma grande diversidade de plantas medicinais, aromáticas e grande potencial de produção de forragem, constituindo, na maioria das vezes, a principal fonte para alimentação animal de bovinos, equinos, ovinos e caprinos na região semiárida (1). No entanto, apesar do potencial dessa vegetação, muitas dessas plantas consumidas pelos animais são tóxicas, mas, devido ao período de estiagem, tornam-se as únicas opções para a alimentação dos animais.

A toxicidade de uma substância é a capacidade intrínseca de afetar negativamente ou causar dano a um organismo. Muitos testes são utilizados para avaliar a toxicidade sistêmica aguda dos animais, e também para classificar e rotular apropriadamente substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade (2).

Na pecuária, as ingestões de plantas tóxicas representam significativa causa de prejuízos econômicos, uma vez que influenciam diretamente na produção animal (3-4). As intoxicações por plantas podem causar modificações genéticas; substâncias, denominadas genotoxinas, possuem potencial de agir no organismo provocando alterações hereditárias ou letais, bem como anomalias neurológicas (5).

Além disso, existe o risco de que a ingestão de plantas tóxicas pelos animais pode atingir o homem. O consumo de leite, carne, ovos ou outros produtos de origem animal pode conter toxinas transferíveis. Por exemplo, o consumo de leite de vacas em pastagens invadidas por *Eupatorium rugosum*, nos Estados Unidos, é responsável por uma doença conhecida como enfermidade do leite (“milksickness”) que pode ocasionar a morte de pessoas devido à presença de alcaloides pirrolizidínicos (6).

Deste modo, vários estudos têm sido realizados, na tentativa de identificar o nível de toxicidade de plantas. O pereiro, *Aspidosperma pyrifolium* é uma das espécies que já foi indicada em estudos relacionados ao conhecimento popular, dos produtores sobre plantas tóxicas aos animais, que observam ocorrência de intoxicação dos animais ao consumir essa planta.

Assim, em virtude da importância econômica que a espécie *Aspidosperma pyrifolium* possui para a pecuária nordestina foi realizado uma revisão bibliográfica

sobre a toxicidade dessa planta, tanto a causada por intoxicações naturais, como as experimentais para comprovar a informação dos produtores.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa foi realizada nas bases de dados LILACs, Scielo, Google Acadêmico, Periódico CAPES, Pubmed e livros sobre os estudos de toxicidade de *Aspidosperma pyrifolium*. A pesquisa bibliográfica incluiu artigos originais e de revisão, teses, dissertações e monografias, nos idiomas inglês e português.

Os descritores utilizados isolados e em várias combinações foram: toxicidade, *Aspidosperma pyrifolium*, Caatinga, plantas tóxicas, pecuária, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade.

Os artigos foram selecionados de acordo com os critérios: abordagem sobre a toxicidade da planta *Aspidosperma pyrifolium*, com estudos publicados até 2014 (brasileiros e internacionais) e exclusão de textos que desviavam do propósito do estudo.

## **3 O BIOMA CAATINGA**

O Bioma Caatinga é o tipo de vegetação que cobre a maior parte da área da região Nordeste do Brasil com clima semiárido (7). Seu nome é originário da língua tupi-guarani, significa “mata branca”. É um sistema ambiental exclusivamente brasileiro, que ocupa, cerca de 11 % do território nacional, num total de 844.453 mil Km<sup>2</sup>, abrangendo os Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia, Maranhão, Piauí e Norte de Minas Gerais (8) (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa demonstrando os Estados que o Bioma Caatinga abrange (Fonte: 9).

É caracterizado por temperaturas anuais elevadas, em torno de 25 a 29°C, o solo é raso e pedregoso, embora bastante fértil, com índice pluviométrico que varia de 300 a 800 mm/ano. As secas são cíclicas e prolongadas, e as chuvas ocorrem no início do ano, sendo suficientes para recuperar o bioma rapidamente (10).

As plantas da caatinga, também chamadas xerófilas, são adaptadas ao clima seco e a escassez de água. Para sua sobrevivência, algumas plantas armazenam água, outras possuem raízes superficiais que captam a água da chuva e há as que lançam outros recursos para diminuir a perda de água (transpiração), com poucas folhas e espinhos. A vegetação é formada por três estratos: o arbóreo, o arbustivo e o herbáceo, compostos por plantas que produzem frutas, cera, óleo vegetal, fibra. A fauna é muito diversificada composta de répteis, insetos, roedores, aves (11).

Embora pouco conhecida botanicamente, a flora da caatinga é bastante explorada pela população local para os mais diversos fins. A falta de avanços tecnológicos e acesso à medicina fazem com que a população de muitas cidades do semiárido, lance mão dos conhecimentos empíricos para utilizar a flora disponível (11).

Desse modo, a região semiárida é marcada pela exploração de seus recursos naturais, uma vez que as atividades agrícolas tradicionais dependem de fatores climáticos que não são favoráveis na região. Uma das principais atividades desenvolvidas nessa região é a pecuária de bovinos, caprinos e ovinos, atividade que depende quase que totalmente da vegetação nativa e das condições climáticas para seu bom desenvolvimento (12).

#### **4 PLANTAS TÓXICAS VERSUS PRODUÇÃO ANIMAL**

Muitas espécies vegetais produzem substâncias capazes de exercer ação tóxica sobre os organismos vivos. É válido ressaltar que muitas plantas são completamente desconhecidas quanto ao potencial de causar intoxicações, sendo a quantidade de plantas potencialmente tóxica muito elevada (13).

As plantas tóxicas de interesse pecuário são aquelas que, quando ingeridas pelos animais, em condições naturais, causam danos à saúde ou mesmo morte dos animais. Além disso, a toxicidade da planta deve ser comprovada experimentalmente (14). No Brasil, foram descritas cerca de 130 espécies de plantas tóxicas (15), mas esse número vem crescendo continuamente. Na região Nordeste são conhecidas pelos menos 38 plantas tóxicas, com algumas delas sendo importantes para bovinos, caprinos e ovinos (16).

Essas plantas são instintivamente evitadas pelos animais quando não há escassez de alimentos. Mas, quando a oferta de alimento diminui, em épocas de escassez de chuva, algumas espécies vegetais passam a ser incluídas na dieta dos animais de uma forma expressiva, pois ainda verdes e em boas condições, apresentam-se como alternativa alimentar. Ao serem ingeridas produzem uma série de efeitos nos diversos tecidos, órgãos ou sistemas, interferindo na produção dos rebanhos e ocasionando, fatalmente, envenenamentos, que podem ser ainda potencializados pelo estado de debilidade física dos animais nos períodos de estiagem (17).

Desse modo, intoxicações por plantas afetam de forma direta e indireta a reprodução e produção animal e, conseqüentemente, a condição econômica e social de produtores e seus familiares. Existem dois tipos de perdas, as diretas e as indiretas.

As perdas diretas são provocadas pela morte de animais, diminuição dos índices reprodutivos (abortos, infertilidade, malformações), redução da produtividade nos animais sobreviventes e outras alterações devidas a doenças transitórias, enfermidades subclínicas com diminuição da produção de leite, carne ou lã e aumento da susceptibilidade a outras doenças devido à imunodepressão (6).

As perdas indiretas são representadas pelos custos do controle de plantas tóxicas nas pastagens, medidas de manejo para evitar as intoxicações, tais como: a utilização de cercas e o pastoreio alternado, bem como, devido à diminuição do valor nutricional da

ferragem, a redução do valor da terra, a substituição dos animais mortos e os gastos associados ao diagnóstico das intoxicações, e ao tratamento dos animais afetados (18).

Há poucos dados sobre perdas indiretas causadas por intoxicações, incluindo perdas reprodutivas causadas por abortos, infertilidade e malformações (19). No Brasil estima-se que morrem anualmente por intoxicações por plantas aproximadamente um milhão de bovinos.

Em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul, a mortalidade anual de bovinos é de 5 %, e dessa mortalidade, 10 a 14 % são causadas pela ingestão de plantas tóxicas. Quanto aos ovinos, no Rio Grande do Sul, a mortalidade anual é de 15 a 20 % e a mortalidade causada por plantas tóxicas representa 7,2 % (6).

O impacto econômico ocasionado no setor justifica, portanto, o crescente esforço para diagnosticar, comprovar cientificamente e caracterizar as intoxicações por plantas em animais de produção com o objetivo de desenvolver técnicas de controle das mesmas para diminuir as perdas econômicas (20).

## **5 ESPÉCIE *ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM***

A espécie *Aspidosperma pyrifolium* Mart., pertencente ao gênero *Aspidosperma*, possui cerca de 260 espécies encontradas desde o México até a Argentina; e à família Apocynaceae que possui cerca de 200 gêneros e 2000 espécies distribuídas em todos os continentes, nas regiões tropicais e subtropicais (21).

Na Região Nordeste a planta é conhecida como pereiro, pau-pereiro, pereiro-vermelho, pau-de-coaru (22). É uma planta que ocorre nos Estados do Nordeste até a Bahia e norte de Minas Gerais. Tem larga dispersão em toda a zona da caatinga, sendo geralmente encontrado na zona do sertão baixo do Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Paraíba, em vários tipos de solos e entre pedras e rochedos. É considerada espécie endêmica da caatinga (23).

É uma árvore de porte regular, podendo atingir em média 5m de altura (24-25) de tronco bem desenvolvido, ereto, mas não muito grosso podendo chegar de 15 a 20 cm de diâmetro (Figura 2). A copa é normal. A casca é lisa e acinzentada, com lenticelas brancas quando a planta é jovem, e rugosa quando mais idosa; as folhas são ovais, simples, amargosas, glabras ou pilosas; suas flores são pequeninas, de cor clara e possuem um perfume muito agradável que exala no ambiente durante a noite. O fruto é

em forma de gota achatada (conhecido popularmente como “galinha”), de cor castanho-claro, com pequenas verrugas de cor cinza; comporta cerca de cinco sementes, aladas e planas; e com dispersão dessas sementes feita através do vento. A madeira do pereiro é de cor clara, moderadamente pesada, macia e de fácil trabalho, resistente e muito durável, de textura fina e uniforme (23). A floração ocorre geralmente no início das chuvas, com a folhagem ainda não desenvolvida ou em início de desenvolvimento, sendo, desse modo, de setembro a janeiro. A frutificação vai de janeiro a março (24-26).



**Figura 2.** Planta adulta do pereiro (Fonte: 11).

O pereiro possui várias utilizações, como a madeira para serviços de carpintaria (25), para fazer carvão, cerca e lenha. Como planta ornamental, por ser uma árvore de pequeno porte e pela beleza da sua copa, pode ser empregada no paisagismo de lugares em geral. Também é utilizada na recuperação de áreas degradadas, inclusive em matas ciliares. É uma das poucas espécies indicadas para a recuperação de áreas em processo de desertificação, por sua importância ecológica e adaptação às mais severas condições de seca e solos rasos ou pedregosos.

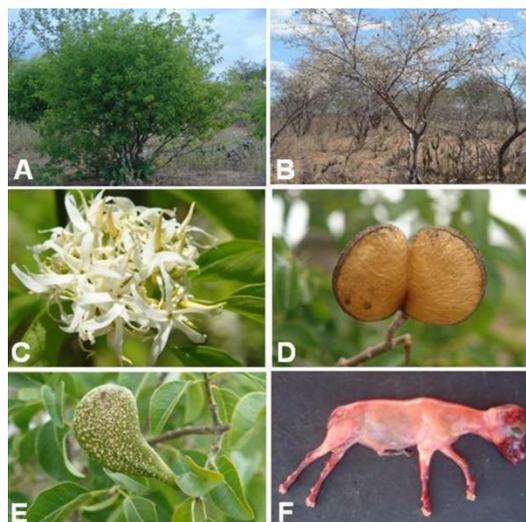
Na medicina caseira, é utilizada no tratamento de distúrbios respiratórios e febres. A casca é utilizada como remédio para o estômago e como anti-emético. Na medicina veterinária popular é utilizado no tratamento de ectoparasitoses dos animais domésticos (sarnas, piolhos e carrapatos) (11). E também pode servir de alimento para bovinos, equinos e caprinos no período de estiagem (27- 28).

## 6 INTOXICAÇÕES NATURAIS COM *ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM*

O potencial tóxico da espécie *Aspidosperma pyrifolium* já vem sendo destacado por vários produtores em vários estudos no Nordeste brasileiro. Em entrevistas aplicadas aos produtores de 17 municípios do Estado do Rio Grande do Norte, especificamente no Seridó Ocidental e Oriental, na busca de plantas tóxicas dessas localidades, o pereiro foi identificado como uma planta tóxica para bovinos, caprinos e ovinos, que causam naturalmente abortos ou nascimento de animais débeis. Também foi identificada a ocorrência de intoxicações com sinais nervosos caracterizados por rigidez dos membros posteriores, com dificuldade de locomoção envolvendo bovinos, muares e equinos. Um destaque para a época de maior ocorrência dessas intoxicações no período de estiagem. Pois nesta época a espécie ainda está verde e suas folhas estão entre as últimas a cair (27).

Outro estudo realizado também no Rio Grande do Norte, nas mesorregiões: Central e Oeste buscou determinar plantas tóxicas de interesse zootécnico em 35 municípios dessas mesorregiões. Nessa situação, os surtos de intoxicações por *Aspidosperma pyrifolium* relatados pelos produtores ocorreram em caprinos e bovinos, acometendo neles malformações, caracterizadas por flexura dos membros pélvicos, prognatia, braquignatia, microftalmia, dermoide ocular e atresia anal (28).

Em Patos, Paraíba a espécie *Aspidosperma pyrifolium*, pereiro, foi identificada como planta tóxica para caprinos. Os animais abortavam quando ingeriam a espécie em diferentes fases de gestação. Também foi observado que os abortos ocorriam no período seco seguido de chuvas. Quando a planta era consumida nos primeiros 35 a 40 dias de gestação das cabras, ocorriam perdas embrionárias (Figura 3.) (20).



**Figura 3.** A-E) *Aspidosperma pyrifolium*. A e B) Árvores. C) Flor. D e E) Vagens. F) Feto de ovelha intoxicada por *A. Pyrifolium* (Fonte: 20).

Um levantamento das intoxicações por plantas em 20 municípios do Sertão Paraibano também foi realizado. Os entrevistados relataram surtos de abortos associados ao consumo da *A. pyrifolium* em caprinos, ovinos e bovinos (29).

Casos espontâneos de aborto em caprinos depois da ingestão da planta também foram observados em 6 fazendas dos municípios de Mossoró-RN e Angicos-RN. A maioria dos casos de aborto ocorreu durante a estação seca e início da estação chuvosa, com as cabras velhas sendo menos afetadas do que as cabras jovens (30).

## **7 INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM *ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM***

Para que uma planta considerada como responsável por intoxicações acidentais ser classificada como espécie tóxica de interesse pecuário, sua toxicidade deve ser comprovada experimentalmente.

Para *A. pyrifolium* alguns estudos experimentais já foram realizados para comprovar sua toxicidade. Em estudo experimental realizado com cabras, em diferentes fases de gestação, alimentadas com folhas verdes recém-colhidas de *A. pyrifolium*, na dose de 4g/kg, durante 19 dias de consumo foi observado que elas foram capazes de provocar aborto e perdas embrionárias. Já as folhas dessecadas não foram capazes de provocar alterações reprodutivas. Embora a ingestão da planta nos primeiros 34 dias de gestação possa causar mortalidade embrionária (30).

Um estudo de toxicidade em ratos e citotoxicidade *in vitro* com extrato etanólico de *Aspidosperma pyrifolium* administrado em ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar demonstrou que as fêmeas apresentaram redução do peso fetal e fortes indícios de toxicidade materna, além de distúrbios motores e morte nas concentrações mais elevadas. Os ratos machos se apresentaram mais resistentes do que as fêmeas. Também foi verificado o extrato de *A. pyrifolium* promoveu hemólise e foi letal para o organismo *Artemia salina* (31).

A toxicidade aguda também já foi testada para *Aspidosperma pyrifolium* em camundongos adultos albinos Swiss, com administração intraperitoneal de extrato metanólico da casca de *A. pyrifolium*. Foram analisadas alterações comportamentais e sinais de toxicidade dos camundongos, como reações com características depressoras, ambulação diminuída, flacidez muscular e analgesia (diminuição dos reflexos). Outros efeitos observados foram contorções abdominais, tônus da musculatura abdominal, espasmos e irritação da conjuntiva. (32),

A toxicidade aguda é definida através de um ensaio para determinar os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período de 24 horas após a administração de uma única dose ou de doses múltiplas. A toxicidade aguda tem por objetivo determinar as reações adversas em curto prazo após a administração de um composto, bem como o binômio: dose – efeito letal (33).

Observa-se a necessidade de estudos a nível genotóxico e mutagênico para *A. pyrifolium* como forma de avaliar com maiores detalhes o que a intoxicação por esta planta pode causar a nível celular, genético e genômico.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Observa-se que é notável a toxicidade da planta *Aspidosperma pyrifolium* tanto espontaneamente quanto nos estudos experimentais e o que ela pode causar perdas econômicas em animais de produção.

Não foi encontrada nenhuma pesquisa sobre aspectos genotóxicos e mutagênicos dessa planta. Esses estudos são importantes, já que em muitas situações a toxicidade de plantas causam modificações genéticas, podendo ser transmitidas hereditariamente.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pinto MSC, Cavalcante MAB, Andrade MVM. Potencial forrageiro da caatinga, fenologia, métodos de avaliação da área foliar e o efeito do déficit hídrico sobre o crescimento de plantas. *Rev. Electrón Vet.* 2004; 7 (4): 1-11.
2. Lopes SG. *Fundamento da Toxicologia Clínica.* São Paulo: Editora Atheneu, 2006.
3. Mello GWS et al. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Norte Piauiense. *Pesq. Vet. Bras.* 2010; 30 (1): 1-9.
4. Barbosa RR, Filho MRR, Silva IPDA, Soto-Blanco B. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo. *Acta Vet. Bras.* 2007; 1(1): 1-7.
5. Fonseca CA, Pereira DG. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Infarma.* 2004. 16:7-8.
6. Riet-Correa F, Medeiros RMT. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesq. Vet. Bras.* 2001. 21(1): 38-42.
7. Rodal MJN, Sampaio EVSB. A vegetação do bioma caatinga. In: Sampaio EVSB, Giulietti AM, Virgínio J, Gamarra-Rojas CFL. (eds). *Vegetação e flora da caatinga.* Recife, Associação de Plantas do nordeste/Centro Nordestino de Informação sobre Plantas, 2002: 11-23.
8. MMA (Ministério do Meio Ambiente). *Caatinga.* Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>. Acesso em: Outubro, 2014.
9. Lacerda A. Nordeste desponta como potencial de energia eólica. Disponível em: <http://antonalacerda.blogspot.com.br/2010/10/nordeste-desponta-como-potencial-de.html>. Acesso em: Julho, 2014.
10. WWF- BRASIL, WORLD WIDE FUND FOR NATURE. *Caatinga.* Disponível em: [http://www.wwf.org.br/natureza\\_brasileira/biomas/bioma\\_caatinga](http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/biomas/bioma_caatinga). Acesso em: Julho, 2014.
11. Santos PBS. Contribuição ao estudo químico, bromatológico e atividade biológica de *Angico Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Var. *Cebil* (Gris.) Alts E PEREIRO *Aspidosperma pyrifolium* Mart. [Dissertação]. Patos: Universidade Federal de Campina Grande; 2010.
12. Moreira JN, Filho CG. Sistemas tradicionais para a produção de caprinos e ovinos. In: Voltolini TV. *Produção de caprinos e ovinos no Semiárido.* Embrapa do Semiárido. 2012; 49-68.
13. Carvalho GD, Arruda VM. *Caderno sobre plantas tóxicas: principais plantas tóxicas causadoras de morte súbita em bovinos.* 1ª ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2011.
14. Rosseti ACPA, Corsy M. *Projeto CAPIM – Pesquisa e Extensão;* Departamento de Zootecnia, ESALQ-USP. 2009.
15. Tokarnia CH et al. *Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção.* 2ª ed. Rio de Janeiro, Helianthus, 2012.
16. Tokarnia CH, Dobereiner J, Peixoto PV. *Plantas tóxicas do Brasil.* Editora Helianthus, Rio de Janeiro. 2000. 310p.
17. Salles HO. *Papel da lectina de folhas de Ipomoea asarifolia R. et Schult na toxicidade a animais e seu envolvimento no mecanismo de defesa da planta.* [Tese]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2008.

18. Afonso E, Pott A. Plantas tóxicas para bovinos. Mato Grosso do Sul: Embrapa Campo Grande. 2000.
19. Riet-Corrêa F, Fioravanti MCS, Medeiros RMT. A pecuária brasileira e as plantas tóxicas. Revista UFG. 2012; 13(13): 83-91.
20. Riet-Correa F, Bezerra CWC, Medeiros RMT. Plantas tóxicas do Nordeste. Sociedade Vicente Pallotti Editora, Universidade Federal de Campina Grande. 2011.
21. Jacome RLP, Oliveira AB, Raslan DS, Wagner H. Chemical constituents and chromatographic profile of the stem bark of *Aspidosperma parvifolium* A. DC (“pau-pereira). Quim. Nova. 2004; 27 (26): 897-900.
22. Correa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil. 5ª ed. Rio de Janeiro: IBDF, 1978.
23. Maia GN. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D&Z Computação, 2004.
24. Braga R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 3ª ed. Fortaleza: ESAM, 1976.
25. Tigre CB. Silvicultura para as matas xerófilas. Fortaleza: DNOCS, 1968.
26. Lima DA. Plantas da Caatinga. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1989.
27. Silva DM, Riet-Correa F, Medeiros RMT, Oliveira OF. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. Pesq. Vet. Bras., 2006; 26 (4): 223-236.
28. Neto SAG, Sakamoto S M, Soto-Blanco B. Inquérito epidemiológico sobre plantas tóxicas das mesoregiões Central e Oeste do Rio Grande do Norte. Cienc. Rural. 2013; 43(7): 1281-1287.
29. Assis TS, Medeiros RMT, Araújo JAS, Dantas AFM, Riet-Correa F. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano. Pesq. Vet. Bras. 2009; 29(11): 919-924.
30. Medeiros RMT, Neto SAG, Riet-Correa F, Schild AL, Sousa NL Mortalidade embrionária e abortos em caprinos causados por *Aspidosperma pyrifolium*. Pesq. Vet. Bras. 2004. 24: 42-43.
31. Lima MCJS, Soto-Blanco B. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyrifolium* Mart.: Biological and cytotoxic effects. Toxicon. 2010; 55: 320-324.
32. Nóbrega MGLA. Perfil fitoquímico e farmacológico da *Aspidosperma pyrifolium* Mart. “Ensaio pré-clínicos”. [Dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2008.
33. Barros SB, Davino SC. Avaliação da toxicidade. In: Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO. (org.). Fundamentos de toxicologia. 2ª ed. São Paulo: Ateneu. 2003: 57-68.

**CAPÍTULO II** – Avaliação da Toxicidade e Citotoxicidade de  
*Aspidosperma pyrifolium* Mart. com o Teste *Allium cepa*

Trabalho submetido a revista:  
REVISTA CAATINGA  
Página eletrônica:  
<http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/sistema>  
ISSN: 1983-2123

## **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart. COM O TESTE *Allium cepa***

EDIGLEYCE DE LIMA COSTA<sup>1\*</sup>, NAAMA JESSICA DE ASSIS MELO<sup>2</sup>, ELIEZER FERNANDES DA SILVA FILHO<sup>2</sup>, JOSÉ CARLOS DA SILVEIRA PEREIRA<sup>2</sup>, LIZ CAROLINA DA SILVA LAGO CORTÊS ASSIS<sup>3</sup>, MARCOS ANTONIO NOBREGA DE SOUSA<sup>3</sup>.

**RESUMO** - A espécie *Aspidosperma pyrifolium* Mart., popularmente conhecida como pereiro, tem sido indicada por vários produtores como sendo tóxica para os animais. Na pecuária, as ingestões de plantas tóxicas representam significativa causa de prejuízos econômicos, uma vez que influenciam diretamente na produção animal. Este trabalho objetivou identificar a existência de efeito tóxico e citotóxico de extratos aquosos de folhas secas e frescas de *A. pyrifolium* sobre o crescimento de raízes e células em divisão do sistema teste *Allium cepa*. O teste foi realizado utilizando três concentrações, 5 mg/L, 50 mg/L e 300 mg/L, sendo o controle negativo água destilada. As análises de crescimento de raízes, inibição relativa e índice mitótico foram utilizados na avaliação da toxicidade e citotoxicidade. Os bioensaios realizados revelaram que o extrato aquoso das folhas secas não mostrou efeito tóxico nem citotóxico nas concentrações testadas, contudo, estimulou a divisão celular na concentração de 50 mg/L, podendo ser um indicativo de formação de células tumorais. As folhas frescas foram tóxicas na concentração de 300 mg/L e teve efeito tóxico subletal na concentração de 5 mg/L, sem promover efeito citotóxico. Em virtude da importância que essa planta tem para a pecuária nordestina, esses dados servem como alerta para os produtores quanto ao consumo dessa planta pelos animais de produção.

**Palavras-chave:** *Aspidosperma pyrifolium*. Extrato. Produção Animal. Índice mitótico. Folha.

\*Autor para correspondência.

<sup>1</sup> Trabalho de dissertação do primeiro autor. Biotecnologista, Discente do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN. \*Correspondência: Rua Francisco Mota, nº105, Costa e Silva, Mossoró-RN. e-mail: edigleycebiotec@gmail.com

<sup>2</sup> Biotecnologistas, Discentes do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

<sup>3</sup> Docente Doutor. Departamento de Ciências Animais – DCAn. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

## **TOXICITY AND CYTOTOXICITY OF *Aspidosperma pyrifolium* Mart. WITH *Allium cepa* TEST**

**ABSTRACT** – The *Aspidosperma pyrifolium* Mart specie, popularly known as pereiro, has been indicated by several producers how toxic to animals. In livestock, the intakes of toxic plants represent significant cause of economic losses, since they influence directly in animal production. This study aimed to identify the existence of toxic and cytotoxic effect of aqueous extracts of dried and fresh leaves of *A. pyrifolium* on root growth and cell division in the test system *Allium cepa*. The test was performed using three different concentrations, 5 mg/L, 50 mg/L and 300 mg/L, and the negative control distilled water. The analysis of roots growth, of inhibition relative and mitotic index were used to evaluate the toxicity and cytotoxicity. The bioassays show that the aqueous extract of dried leaves showed no toxic or cytotoxic effect at the concentrations tested, however, stimulated cell division in a concentration of 50 mg/L, which could be indicative of formation of tumor cells. The fresh leaves were toxic at the concentration of 300 mg/L and had a effect toxic sublethal on concentration of 5 mg/L without causing a cytotoxic effect. Because of the importance that this plant has to cattle raising northeastern, these data serve as a warning to producers as the consumption of this plant for production animals.

**Keywords:** *Aspidosperma pyrifolium*. Extract. Livestock. Mitotic Index. Leave.

## 1 INTRODUÇÃO

As intoxicações de animais de produção por plantas são importantes causas de perdas econômicas nas diferentes regiões do Brasil (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001). Uma planta tóxica de interesse pecuário é aquela que, quando ingerida pelos animais, em condições naturais, causa danos à saúde ou mesmo morte (ROSSETTI; CORSY, 2009).

Uma planta apontada como tóxica através de conhecimento popular é a espécie *Aspidosperma pyrifolium*, conhecida como pereiro. Os principais efeitos tóxicos evidenciados por essa planta são danos ao sistema reprodutivo e nervoso dos animais (SILVA et al, 2006; ASSIS et al., 2009; RIET-CORREA et al., 2011; NETO et al., 2013, MEDEIROS et al., 2004; FERREIRA, 2014).

Apesar desses efeitos, os estudos sobre a toxicidade e a citotoxicidade de *Aspidosperma pyrifolium* ainda são escassos. O uso de ensaios biológicos, como o teste *Allium cepa* L., para a avaliação da bioatividade de extratos de plantas tem sido frequentemente incorporado na identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas (NOLDIN et al, 2003).

Fonseca e Pereira, (2004) destacam que a toxicidade de plantas causam modificações genéticas. Estas substâncias, denominadas genotoxinas, agem no organismo provocando alterações hereditárias ou letais, bem como anomalias neurológicas. Riet-Correa e Medeiros (2001) enfatizam o risco que a ingestão de plantas tóxicas pelos animais pode causar ao homem. O consumo de leite, carne, ovos ou outros produtos de origem animal pode conter toxinas transferíveis. Segundo estes autores, o consumo de leite de vacas em pastagens invadidas por *Eupatorium rugosum*, nos Estados Unidos, é responsável por uma doença conhecida como enfermidade do leite (“milksickness”) que pode ocasionar a morte de pessoas devido à presença de alcalóides pirrolizidínicos.

A pesquisa sobre plantas tóxicas tem-se limitado, prioritariamente, à identificação das espécies e à determinação dos sinais clínicos da patologia e alguns aspectos da epidemiologia das intoxicações. Poucos esforços têm sido realizados para determinar os princípios ativos das plantas e seus mecanismos patogênicos (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001).

Desse modo, o índice mitótico pode ser aplicado como um indicador de proliferação adequada das células (GADANO et al, 2002), e utilizado nos testes de citotoxicidade, como o do sistema teste vegetal *A. cepa* (MAJER et al., 2005; TURKOGU et al., 2008).

Assim objetivou-se avaliar o efeito de concentrações do extrato aquoso de folhas secas e folhas frescas da espécie *Aspidosperma pyrifolium* sobre o crescimento de raízes e a divisão celular de células meristemáticas radiculares de cebola.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de folhas de *Aspidosperma pyrifolium* foram coletadas na fazenda Vista Bela, localizada no município de Angicos, RN durante a estação seca. Exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), sob número de identificação 14525 (ANEXO A).

Para obtenção do extrato aquoso das folhas secas (EAS), as folhas foram colocadas para secar naturalmente, e depois trituradas em liquidificador até sua transformação em um pó fino. As concentrações dos extratos aquosos foram determinadas pela razão massa/volume (m/v), misturando 10 g do pó do material vegetal em 100 mL de água destilada, ficando em repouso por 24 horas. Após repouso, foi realizada uma filtragem e o material foi centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm (TORRES et al, 2006, com adaptações).

O extrato aquoso das folhas frescas (EAF) foi obtido homogeneizando 100 g de folhas de *Aspidosperma pyrifolium* em 1000 mL de água destilada em liquidificador comum, por cerca de 10 minutos. O material foi filtrado em malha fina de organza e em seguida centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm (BARBOSA, 2008).

O teste *Allium cepa* L. em bulbo foi realizado segundo a metodologia de Fiskesjo (1985), com adaptações. O experimento constou de quatro tratamentos divididos em: controle negativo (água destilada) e diluições dos extratos nas doses de 5mg/L, 50mg/L e 300 mg/L. com 05 (cinco) bulbos por tratamento.

Os bulbos de cebolas da espécie *A. cepa*, com catafilos externos brancos, de mesmas origens, não germinados e saudáveis, foram adquiridos comercialmente de supermercados da cidade de Mossoró-RN, Brasil, e mantidos em local livre de umidade e ao abrigo da luz.

Antes do teste, os catafilos externos secos foram removidos com bisturi, cuidando-se para que a área radicular não fosse danificada. Em seguida, os bulbos foram postos em água da torneira por duas horas para reduzir os efeitos de possíveis inibidores do brotamento.

Cada concentração teste foi distribuída em recipientes de vidro, com capacidade de 100 ml e um bulbo foi colocado em cada recipiente com a área radicular em contato com o extrato (KOVALCHUK et al, 1998).

O volume de solução absorvido foi repostado diariamente para manter as raízes mergulhadas nos extratos. Após 72 horas as três maiores raízes foram medidas com o auxílio de um paquímetro, sendo o comprimento das raízes utilizado como avaliação da toxicidade, calculando-se o crescimento médio das raízes. Além disso, foi calculada a Inibição Relativa (IR) do crescimento, utilizando a equação  $IR = 100 - (ICR \times 100)$ , onde ICR é o Índice de Crescimento Relativo. O ICR foi obtido utilizando a equação  $ICR = CRA / CRC$ , onde, CRA é o Comprimento da Radícula na Amostra, CRC é o Comprimento da Radícula no Controle Negativo.

Após a mensuração do tamanho das raízes dos bulbos nas 72 h, as raízes (três raízes de cada bulbo) foram colocadas em solução fixadora de Carnoy (etanol: ácido acético – 3:1) durante 24h. Para o preparo das lâminas, as raízes foram retiradas do fixador, lavadas em água destilada (3 banhos de 5 min), hidrolisadas em HCl 1N a 60 °C por 11 minutos e lavadas mais uma vez em água destilada. Em seguida, com auxílio de uma pinça e de uma lâmina de bisturi, a coifa (porção apical da raiz) de aproximadamente 1 mm a 2 mm de comprimento foi retirada e colocada sob uma lâmina. Adicionou-se uma gota de carmim acético 2% e deixou-se corar durante 5 minutos. A lamínula foi então colocada sobre a lâmina e feito o *squash* (esmagamento) com o dedo polegar, com razoável pressão (GUERRA; SOUZA, 2002). O material preparado foi então levado ao microscópio óptico para observação no aumento de 1000X e, posteriormente, fotografado para melhor e mais eficiente leitura.

O seguinte parâmetro foi observado: índice mitótico (IM) (1000 células por bulbo). O IM corresponde à relação do número de células em divisão e total de células observadas, em porcentagem, sendo analisada a presença de prófase, metáfase, anáfase e telófase. Também foi calculado o valor limite da citotoxicidade, segundo a equação: Valor limite da citotoxicidade =  $IMA / IMC \times 100$ , onde, IMA é o índice mitótico da amostra, IMC é o índice mitótico do controle negativo

As avaliações estatísticas foram realizadas por comparação ao controle negativo através do método de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's ( $p < 0,05$ ). Todos os dados foram previamente testados sobre normalidade e heterocedasticidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e Levene (ZAR, 1999) e revelaram não estarem com distribuição normal. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software R, versão 3.2.0.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de toxicidade com *Allium cepa* L. expostas ao extrato aquoso de folhas secas (EAS) e ao extrato aquoso de folhas frescas (EAF) de *A. pyrifolium*, expressos por média  $\pm$  desvio padrão, e os valores do teste de inibição do crescimento de raízes de *A. cepa* estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Crescimento médio (mm) e inibição relativa de raízes de bulbo de *Allium cepa* L. expostas ao extrato aquoso das folhas secas (EAS) e frescas (EAF) de *Aspidosperma pyrifolium*. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* ( $p < 0,05$ ) diferença significativa entre as concentrações e o controle. Método de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's.

Concentração	Crescimento médio (mm) $\pm$ SD		Inibição relativa (%)	
	EAS	EAF	EAS	EAF
Controle	15,5 $\pm$ 9,9	10,9 $\pm$ 16,0	-	-
5 mg/L	12,7 $\pm$ 19 <sup>ns</sup>	5,8 $\pm$ 6,3 <sup>ns</sup>	18	47
50 mg/L	16,1 $\pm$ 14 <sup>ns</sup>	5,3 $\pm$ 11 <sup>ns</sup>	-4	52
300 mg/L	10,4 $\pm$ 16 <sup>ns</sup>	0,0 $\pm$ 0,0*	33	100

SD= desvio padrão, ns ( $p > 0,05$ ) = valores não significativos.

A análise do crescimento de raízes tratados com o extrato aquoso de folhas secas (EAS) indicou que não houve aumento ou diminuição significativa no comprimento das raízes em relação ao controle. No entanto, houve um estímulo ao crescimento na concentração de 50 mg/L (Tabela 01) no valor de -4%. De modo que, esses resultados mostram que as concentrações estudadas do extrato aquoso de folhas secas não foram capazes de causar toxicidade nas células de *Allium cepa* nas condições experimentais.

Já o extrato aquoso de folhas frescas (EAF) provocou uma redução no crescimento de raízes, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), apenas na concentração de 300 mg/L. Contudo, o extrato inibiu o crescimento das raízes em todas concentrações testadas, sendo de 100% na concentração de 300 mg/L, comprovando o potencial tóxico do extrato aquoso de folhas frescas de *A. pyrifolium* nessa concentração sobre células vegetais de bulbo de cebola (Tabela 1).

Não houve diferença estatística significativa no crescimento médio de raízes comparando o extrato aquoso seco e o extrato aquoso verde da espécie *A. pyrifolium* utilizando método de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's ( $p < 0,05$ ).

Sistemas vegetais, como *A. cepa*, têm sido bem aceitos por pesquisadores para estudo dos efeitos de extratos vegetais (FACHINETTO et al., 2007), por meio de parâmetros macroscópicos como alteração de cor, formato, tamanho da raiz e deformidade, visando a

avaliação do potencial tóxico de muitos compostos (LONGHIN, 2008). Jardim (2004) e Vicentini et al. (2001) ressaltam que a avaliação por crescimento das raízes tem se mostrado útil nessa detecção, pois as raízes ficam em contato direto com a substância testada, permitindo a avaliação de diferentes concentrações.

Os efeitos tóxicos só se manifestam em organismos se o agente tóxico alcançar locais específicos do organismo, em concentrações e tempo suficientes para produzir algum tipo de efeito (MACEDO et al., 2014). Consequentemente, resultados positivos no teste de *Allium cepa* devem ser considerados como um alerta e também um indicativo de que o extrato testado pode ser um risco à saúde dos organismos expostos (FISKESJÖ, 1985).

Os dados obtidos neste trabalho sobre toxicidade de crescimento de raízes são importantes, devido a espécie *A. pyrifolium* servir como opção alimentar para os animais de produção da Caatinga em períodos de seca. Alguns relatos de produtores já evidenciaram a toxicidade dessa planta quando consumida por bovinos, caprinos e ovinos, tendo efeitos no sistema reprodutivo e nervoso, principalmente quando eles consomem a planta verde (MEDEIROS et al., 2004; SILVA et al., 2006; ASSIS et al., 2009; NETO et al., 2013; RIET-CORREA et al., 2011; FERREIRA, 2014), o que corrobora com os resultados obtidos de toxicidade do extrato aquoso de folhas verdes utilizando como sistema teste o *A. cepa*

Essa toxicidade pode estar associada a presença de constituintes químicos ou princípios ativos tóxicos encontrados nos vegetais. Dentre os principais metabólitos causadores de intoxicação está as toxalbuminas (ricina e curcina), provenientes do metabolismo primário das plantas; alcalóides, terpenos e compostos fenólicos diversos, do metabolismo secundário. Deve-se destacar, ainda, que a intoxicação vai depender da quantidade de substância tóxica absorvida, da natureza dessa substância e da via de introdução (HARAGUCHI, 2003; MELLO et al., 2010).

Para a espécie *A. pyrifolium*, Santos (2010) revelou que essa planta é detentor de alcaloides e taninos. Nóbrega (2008), relata a presença de triterpenos, esteroides, iridóides, saponinas, açúcares redutores e ausência de glicosídeos cardíacos para *Aspidosperma pyrifolium* Mart. Desse modo, a toxicidade do extrato aquoso de folhas frescas pode estar associada a presença desses compostos orgânicos.

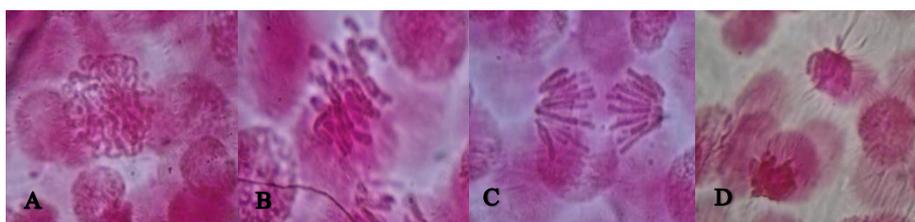
Segundo Rice (1984), alguns compostos podem interferir no desenvolvimento de outras plantas quando em altas concentrações, mas, em outras menores, podem não estimular o mesmo processo. Isto pode ser o que ocorreu com o extrato de folhas secas. Visto que compostos orgânicos são compostos voláteis (FERREIRA; AQUILA, 2000), o processo de secagem das folhas pode desencadear a diminuição desses compostos na planta.

É possível que a alta concentração de alguns compostos químicos tenha um efeito (inibitório ou estimulatório) no ciclo celular, como tem sido mostrado para cafeína em *Drosophila prosaltans* (ITOYAMA et al., 1997), mefloquina em linfócitos humanos (GRISOLIA et al., 1995), extratos de *Alpinia mutans* e *Pogostemon heyneanus* nas células de raízes de *Allium cepa* (DIAS; TAKAHASHI, 1994), glaucolide B extraído de *Vernonia eremphila* Mart. em linfócitos humanos (BURIM et al., 1999; CAMPAROTO et al., 2002), e infusões de *Achyrocline satureioides* DC nas células de raízes de *Allium cepa* (FACHINETTO et al., 2007).

Desse modo, o índice mitótico constitui um parâmetro importante para a avaliação da toxicidade celular de diversas substâncias, onde a citotoxicidade de determinado agente químico pode ser determinada pelo aumento ou pela diminuição do IM. Índices mitóticos maiores que o controle negativo são resultados de um aumento na divisão celular, que pode ser prejudicial para as células, levando a uma proliferação celular desordenada e até mesmo para a formação de tecidos tumorais. A redução significativa do IM em relação ao controle negativo pode indicar alterações, derivadas da ação química do agente sobre o crescimento e desenvolvimento do organismo exposto (HOSHINA, 2002).

Nesse sentido, os ensaios de citotoxicidade foram realizados com os extratos secos e frescos utilizando bulbos de cebola. Os resultados dos ensaios em função do índice mitótico (IM), estágios da mitose e do valor limite de citotoxicidade das células de *Allium cepa* estão apresentados na Tabela 2.

Na Figura 1 estão expostas as fotografias das fases identificadas da divisão celular do tipo mitose.



**Figura 1.** Células de cebola em mitose. A= prófase, B= metáfase, C= anáfase, D= telófase. Fonte: Edigleyce Costa

**Tabela 2.** Total de células, células em mitose observadas ao microscópio, valores do índice mitótico (%), fases da mitose e limite de citotoxicidade (%) de células de raiz de *Allium cepa* após a exposição ao extrato aquoso de folhas secas (EAS) e frescas (EAF) de *Aspidosperma pyrifolium*. Método de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's.

Extrato	Concentração	Índice mitótico (%) ± SD	Fases da mitose				Valor limite de citotoxicidade
			Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	
EAS	Controle	3,36±1,50	23,6±14,53	6,2±4,08	3,8±3,42	0±0	100
	5 mg/L	6,6±0,14 <sup>ns</sup>	46,5±13,43 <sup>ns</sup>	14,5±10,6 <sup>ns</sup>	4,5±2,12 <sup>ns</sup>	0,5±0,7 <sup>ns</sup>	196
	50 mg/L	20,03±17,16*	183,6±154,8*	8,0±7,0 <sup>ns</sup>	6±7,2 <sup>ns</sup>	2,6±3,05 <sup>ns</sup>	596
	300 mg/L	8,7±2,26 <sup>ns</sup>	77,5±16,26 <sup>ns</sup>	7±7,07 <sup>ns</sup>	2±0,0 <sup>ns</sup>	0,5±0,70 <sup>ns</sup>	259
EAF	Controle	8,96±3,86	67,3±39,0	12,3±5,13	5,3±1,52	4,6±4,72	100
	5 mg/L	3,52±1,74 <sup>ns</sup>	20±18,34 <sup>ns</sup>	9,75±8,26 <sup>ns</sup>	4,7±4,34 <sup>ns</sup>	0,75±0,9 <sup>ns</sup>	39
	50 mg/L	14,9±11,31 <sup>ns</sup>	133,5±116,67 <sup>ns</sup>	12±1,41 <sup>ns</sup>	2,5±0,7 <sup>ns</sup>	1±1,41 <sup>ns</sup>	166
	300 mg/L	ND	ND	ND	ND	ND	-

ND= Não determinado, ns (p>0,05) valores não significativos. \* (p<0,05) diferença significativa entre as concentrações e o controle negativo

Observa-se que nenhuma das concentrações testadas do extrato aquoso de folhas secas (EAS) causou citotoxicidade nas células de *Allium cepa* e nem nos estágios da mitose quando comparando ao controle. De modo que o extrato não foi considerado citotóxico para as amostras testadas, aplicando-se o método de Kruskal-Wallis com o teste de Dunn's ( $p < 0,05$ ).

Contudo, houve um aumento significativo da divisão celular na concentração de 50 mg/L do EAS, principalmente na fase de prófase, o que pode ser prejudicial para células, podendo ser um indicativo de que o extrato aquoso de folhas secas dessa planta pode causar a formação de tecidos tumorais (Tabela 2).

No EAF o índice mitótico da concentração de 300 mg/L não pôde ser determinado, pois não houve crescimento de raízes e, isto portanto, impossibilitou a confecção de lâminas para a análise.

Também não houve diferença estatística significativa do índice mitótico e nem das fases da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) quando comparando o EAS com o EAF.

Para os valores de limite de citotoxicidade, valores abaixo de 50% indicam efeito subletal, e abaixo de 22%, letal (MIGID et al., 2007). Desta forma, é possível observar que o extrato aquoso de folhas secas em nenhuma das concentrações teve efeito citotóxico nas células, pois pelo contrário, houve aumento da divisão celular. Todavia, no extrato aquoso de folhas frescas é possível notar que existe um efeito tóxico subletal no organismo na concentração de 5 mg/L (Tabela 2).

Estes resultados corroboram com o fato da espécie *A. pyrifolium* possuir taninos e flavonoides em sua composição, e esses compostos e sua atividade enzimática estarem relacionados em algumas plantas a inibição da divisão celular de *Allium cepa* (TEIXEIRA et al., 2003; SHI et al., 2001; DELMULLE et al., 2006; BORGES-ARGÁEZ et al., 2007; KNOLL et al., 2006; FACHINETTO et al., 2007).

Outro fato preocupante foi a observação *in loco*, na Fazenda Vista Bela, de caprinos se alimentando à vontade tanto das folhas secas caídas ao chão quanto das verdes, o que denota a importância deste trabalho para a produção animal.

#### **4 CONCLUSÕES**

O extrato aquoso de folhas secas não apresentou efeito tóxico e nem citotóxico nas células de *Allium cepa* L. nas concentrações testadas, contudo, na concentração de 50 mg/L houve estímulo da divisão celular, o que pode ser um indicativo de formação de células

tumorais. Já o extrato aquoso de folhas frescas apresentou efeito tóxico na concentração de 300 mg/L, e efeito tóxico subletal na concentração de 5 mg/L, apesar de não apresentar citotoxicidade. Não houve diferença estatística significativa quando comparado os dois extratos quanto ao crescimento médio de raízes, índice mitótico e fase da mitose.

Em virtude da importância que essa planta tem para a pecuária nordestina, esses dados servem como alerta para os produtores quanto ao consumo dessa planta pelos animais de produção.

## 5 REFERÊNCIAS

ASSIS, T. S. et al. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 29, n. 11, p. 919-924, 2009.

BARBOSA, D.B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidantes e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill (Anacardiaceae)**. 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2008.

BORGES-ARGÁEZ, R. et al. Cytotoxic and antiprotozoal activity of flavonoids from *Lonchocarpus* spp. **Phytomedicine**, Stuttgart, Estados Unidos, v. 14, n. 7, p. 530-533, 2007.

BURIM, R.V. et al. Genotoxic action of the sesquiterpene lactone glaucolide B on mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Genetics and Molecular Biology** v. 22, p. 401-406, 1999.

CAMPAROTO, M. L. et al. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 85-89, 2002.

DELMULLE, L. et al. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. **Phytomedicine**, Stuttgart, Estados Unidos, v. 13, n. 9-10, p. 732-734, 2006.

DIAS, F. L.; TAKAHASHI, C. S. Cytogenetic evaluation of the effect of aqueous extracts of the medicinal plants *Alpinia nutans* Rose (Zingiberaceae) and *Pogostemon heyneanus* Benth (Labiatae) on wistar rats and *Allium cepa* Linn. (Liliaceae) root tip cells. **Revista Brasileira de Genética** v. 17, p. 175-180, 1994.

FACHINETTO, J. M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 49-54, 2007.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, Paraná, v. 12, Edição especial, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, F. W. S. **Levantamento da vegetação da caatinga utilizada na alimentação animal no oeste potiguar**. 2014. 64f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró. 2014.

FISKESJÖ, G. The *Allium test* as standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Landskrona, Suécia, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v.16, p.7-8, 2004.

GADANO, A. et al. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, Estados Unidos, v. 81, n. 1, p. 11-16, 2002.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: Funpec, 2002. 131p.

GRISOLIA, C. K. *In vitro* and *in vivo* tests in humans confirm that the antimalarial drug mefloquine is not mutagenic. **Brazilian Journal of Genetics**, v.18, p.611-615, 1995.

HARAGUCHI, M. Plantas tóxicas de interesse na pecuária. **Biológico**, v.65, n.1/2, p.37-39, 2003.

HOSHINA, M. M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro município de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***. 2002. 52f. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2002.

ITOYAMA, M. M. et al. Effects of caffeine on mitotic index in *Drosophila prosaltans* (Diptera). **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p. 655-657, 1997.

JARDIM, G. M. **Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do Rio Corumbataí, São Paulo**. 2004. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

KNOLL, M. F. et al. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 539-542, 2006.

KOVALCHUK, O. et al. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, Amsterdam, Holanda, v. 415, n. 1-2, p. 47-57, 1998.

LONGHIN, S. R. **Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos**. 2008. 154 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

MACEDO, J. F. M. et al. Estudo da genotoxicidade do extrato de *Abelmoschus esculentus* (Quiabo) pelo teste *Allium cepa*. **Revista Saúde em Foco**, v. 1, n. 1, art. 2, p. 15-28. 2014.

MAJER, B. J. et al. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, Malden, Estados Unidos, v. 33, p. 45-55, 2005.

MEDEIROS, R. M. T. et al. Mortalidade embrionária e abortos em caprinos causados por *Aspidosperma pyrifolium*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 42-43, 2004.

MELLO, G.W.S. et al. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Norte Piauiense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n.1, p.1-9, 2010.

MIGID, H. M. A. et al. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Nova York, Estados Unidos, v. 6, n. 1, p. 57-64, 2007.

NETO, S. A. G. et al. Inquérito epidemiológico sobre plantas tóxicas das mesoregiões Central e Oeste do Rio Grande do Norte. **Ciência Rural**, Santa Maria, Rio Grande do Sul, v. 43, n. 7, p. 1281-1287, 2013.

NÓBREGA, M. G. L. A. **Perfil fitoquímico e farmacológico da *Aspidosperma pyrifolium* Mart. “Ensaios pré-clínicos”**. 2008. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

NOLDIN, V. F. et al. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. Cultivada no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2 ed. Orlando, Academic Press., 1984.

RIET-CORREA, F. et al. **Plantas tóxicas do Nordeste**. Sociedade Vicente Pallotti Editora. Universidade Federal de Campina Grande, Patos – PB. 2011. 79 p.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa veterinária brasileira**, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2001.

ROSSETI, A. C. P. A.; CORSY, M. **Projeto CAPIM – Pesquisa e Extensão**; Departamento de Zootecnia, ESALQ-USP. Abril de 2009.

SANTOS, P. B. S. **Contribuição ao estudo químico, bromatológico e atividade biológica de Angico *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Var. Cebil (Gris.) Alts E PEREIRO *Aspidosperma pyriforme* Mart.** 2010. 46 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia: Área de Concentração em Sistemas Agrossilvipastoris no Semiárido. Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2010.

SHI, Y. Q. et al. Cytotoxic flavonoids with isoprenoids groups from *Morus mongolica*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, Estados Unidos, v. 64, n. 2, p.181-188, 2001.

SILVA, D. M. et al. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesquisa veterinária brasileira**, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 223-236, 2006.

TEIXEIRA, R. O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 551-555, 2003.

TORRES, A. L. et al., Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyriforme* no desenvolvimento e oviposição de *plutella xylostella*. **Bragantia**, Campinas, São Paulo, v. 65, n. 3, p. 447-457, 2006

TURKOGU, S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, Inglaterra, v. 46, n. 6, p. 2035-2041, 2008.

VICENTINI V. E. P. et al. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, Maringá, Paraná, v. 23, n. 2, p. 593-598, 2001.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**, 4th edn. Prentice Hall, Upper Saddle River. 1999.

**CAPÍTULO III - Toxicidade Aguda e Efeitos Citotóxicos e Mutagênicos do Extrato Aquoso de Folhas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. em *Mus musculus*.**

Trabalho submetido a revista:

REVISTA CAATINGA

Página eletrônica:

<http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/sistema>

ISSN: 1983-2123

## **TOXICIDADE AGUDA E EFEITOS CITOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart. EM *Mus musculus*.**

EDIGLEYCE DE LIMA COSTA<sup>1</sup>, NAAMA JESSICA DE ASSIS MELO<sup>2</sup>, ELIEZER FERNANDES DA SILVA FILHO<sup>2</sup>, JOSÉ CARLOS DA SILVEIRA PEREIRA<sup>2</sup>, CARLOS CAMPOS CAMARA<sup>3</sup>  
MARCOS ANTONIO NOBREGA DE SOUSA<sup>3</sup>.

**RESUMO** - As intoxicações de animais por plantas são importantes causas de perdas econômicas nas diferentes regiões do Brasil. A espécie *Aspidosperma pyrifolium* Mart., tem sido indicada por vários produtores como sendo tóxica para os animais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda da planta em camundongos, submeter os animais ao *screening* hipocrático e avaliar os efeitos citotóxicos e mutagênicos do extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium*. Realizou-se investigação da DL50 utilizando grupos de camundongos *Swiss* machos e fêmeas inoculados, por via intraperitoneal, com diluições seriadas do extrato aquoso das folhas frescas de pereiro. Após a inoculação, os animais foram observados por um período de 14 dias, para determinar a quantidade de mortos, doentes e sobreviventes e foram também pesados. Para o teste de micronúcleo e análise de células binucleadas foi feita a extração da medula óssea dos animais, através dos dois fêmures. A espécie *A. pyrifolium* mostrou-se letal para as fêmeas a partir da concentração de 900 mg/Kg e para os machos a partir também da concentração de 900 mg/Kg, obtendo uma dose letal mediana de 750,63 mg/Kg. Os animais avaliados apresentaram alterações comportamentais, principalmente no sistema nervoso, e um aumento significativo no peso médio total nas concentrações de 600 mg/Kg e 900 mg/Kg, comparado à concentração de 5 mg/Kg. As concentrações testadas não mostraram potencial mutagênico e citotóxico. Novos estudos devem ser realizados visando obter mais dados de toxicidade dessa planta para assegurar o uso em saúde humana e animal.

**Palavras-chave:** Micronúcleo. Célula Binucleada. Pereiro. Screening. Camundongos.

\*Autor para correspondência.

<sup>1</sup> Trabalho de dissertação do primeiro autor. Biotecnologista, Discente do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN. \*Correspondência: Rua Francisco Mota, nº105, Costa e Silva, Mossoró-RN. e-mail: edigleycebiotec@gmail.com

<sup>2</sup> Biotecnologistas, Discentes do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

<sup>3</sup> Docente Doutor. Departamento de Ciências Animais – DCAn. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

<sup>3</sup> Docente Doutor. Departamento de Ciências Animais – DCAn. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

## **TOXICITY ACUTE AND EFFECTS CYTOTOXIC AND MUTAGENIC OF EXTRACT SHEETS AQUEOUS *Aspidosperma pyriforme* IN *Mus musculus*.**

**ABSTRACT** – Animal poisonings by the plants are important causes of economic losses in different regions of Brazil. The *Aspidosperma pyriforme* Mart species., has been indicated by several producers to be toxic to animals. The objective of this study was to evaluate the acute toxicity of the plant in mice, the animals undergo the screening hippocratic and evaluate the cytotoxic and mutagenic effects of aqueous extract of fresh leaves of *Aspidosperma pyriforme*. Research the LD50 was carried out using the groups of mice Male and females Swiss were inoculated intraperitoneally with serial dilutions of the aqueous extract of fresh leaves pereiro. After inoculation, the animals were observed for a period of 14 days to determine the amount of dead animals and survivors and were also weighed. For the micronucleus test and binucleated cell analysis was done extracting bone marrow of animals, through the two femurs. The specie *A. pyriforme* it was lethal to females from the concentration of 900 mg/kg and for males from the concentration of 900 mg/kg, obtaining a median lethal dose of 750,63 mg/kg. The evaluated animals showed behavioral changes mainly in the nervous system, and a significant increase in the total average weight concentrations of 600 mg/kg and 900 mg/kg, compared to 5 mg/kg. The concentrations tested showed no mutagenic and cytotoxic potential. Further studies should be conducted to get more plant toxicity data to ensure the use in human and animal health.

**Keywords:** Micronucleus. Cell Binucleated. Pereiro. Screening. Mice.

## 1. INTRODUÇÃO

Em um sistema de criação essencialmente extensivo, como o adotado na maioria das regiões do Brasil, a ingestão de plantas tóxicas representa uma importante causa de problemas relacionados ao estado sanitário do rebanho bovino, caprino e ovino, afetando diferentes áreas da saúde animal (SALLES, 2008).

Uma planta considerada como tóxica pelo conhecimento popular dos produtores na Região Nordeste é a espécie *Aspidosperma pyriformium* Mart. Ela pertence ao gênero *Aspidosperma* que possui cerca de 260 espécies encontradas desde o México até a Argentina (JACOME et al., 2004). Popularmente esta espécie é conhecida como pereiro, pau-pereiro, pereiro-vermelho, pau-de-coaru (CORREA, 1978).

É utilizada na medicina caseira, no tratamento de distúrbios respiratórios e febres. A casca é utilizada como remédio para o estômago e como anti-emético. Na medicina veterinária popular é utilizado no tratamento de ectoparasitoses dos animais domésticos (sarnas, piolhos e carrapatos) (SANTOS, 2010). E também pode servir de alimento para bovinos, equinos e caprinos no período de estiagem (SILVA et al, 2006; ASSIS et al., 2009; RIET-CORREA et al., 2011; RIET-CORREA; MEDEIROS, 2011; NETO et al., 2013, MEDEIROS et al., 2004; FERREIRA, 2014).

No entanto, *A pyriformium* pode apresentar efeitos tóxicos, e afetar o sistema reprodutivo e nervoso dos animais. Esse fato está relacionado ao consumo da planta no período seco seguido de chuvas que fazem com que o pereiro rebrote rapidamente e seja consumido pelos animais em gestação, ou após o período de chuvas, quando o pereiro está verde (SILVA et al, 2006; ASSIS et al., 2009; RIET-CORREA et al., 2011; RIET-CORREA; MEDEIROS, 2011; NETO et al., 2013, MEDEIROS et al., 2004; FERREIRA, 2014).

A toxicidade de uma substância é a capacidade intrínseca de afetar negativamente ou causar dano a um organismo. Muitos testes são utilizados para avaliar a toxicidade sistêmica aguda dos animais, e também para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade (LOPES, 2006).

O ensaio para determinar a toxicidade aguda é definido como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período de 24 horas após a administração de uma única dose ou de doses múltiplas. A toxicidade aguda tem por objetivo determinar as reações

adversas em curto prazo após a administração de um composto, bem como o binômio dose – efeito letal (BARROS; DAVINO, 2003).

Dentre os métodos para investigação de toxicidade genética *in vivo*, o teste de micronúcleo em células da medula óssea de camundongos tem sido amplamente empregado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica (MATEUCA et al., 2006). Este teste detecta alterações genômicas ou/e dano ao aparato mitótico, sendo os micronúcleos indicativos de perdas irreversíveis de DNA. Embora a toxicidade genética não seja medida de carcinogenicidade, esta é frequentemente associada ao aparecimento do câncer, visto que, existe uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e no homem (AZEVEDO et al., 2003; REZENDE et al., 2006). Existe, portanto, a necessidade de trabalhos sobre a relação entre a citotoxicidade, mutagenicidade e toxicidade aguda (BOTHAN, 2003).

Desse modo, apesar da espécie *Aspidosperma pyrifolium* já ter sido indicada como tóxica através do conhecimento popular, a avaliação experimental do potencial tóxico dessa planta é escassa. Assim, buscou-se avaliar as propriedades tóxicas através da determinação da toxicidade aguda em camundongos, do screening hipocrático, e da avaliação dos efeitos citotóxicos e mutagênicos do extrato aquoso de folhas frescas de *A. pyrifolium* por meio do teste do micronúcleo e células binucleadas em células de medula óssea de camundongos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os espécimes de *A. pyrifolium* foram coletados na fazenda Vista Bela, localizada no município de Angicos, RN durante a estação seca. As exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), sob número de identificação 14525 (ANEXO A).

As concentrações dos extratos aquosos das amostras de folhas frescas foram determinadas pela razão massa/volume (m/v), misturando 10 g de *A. pyrifolium* em 100 mL de água destilada (1:10) para as concentrações de 5, 50, 300 e 600 mg/Kg e 50 g de *A. pyrifolium* em 100 mL de água destilada para as concentrações de 900 e 1200 mg/Kg. O material foi filtrado em malha fina e em seguida centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm (BARBOSA, 2008).

Nos experimentos foram utilizados grupos de 6 camundongos (30-50g), três machos e três fêmeas, da linhagem Swiss (*Mus musculus*) obtidos do biotério da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), concedidos após aprovação pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Federal Rural do Semiárido sob parecer nº 27/2014 (ANEXO B).

Para estabelecimento da dose letal mediana, os camundongos receberam doses únicas de 5, 50, 300, 600, 900 e 1200 mg/Kg (OECD, 2001) através da administração intraperitoneal de uma única dose, além de um controle negativo (solução salina 0,9% - m/v no volume de 10 ml/Kg de peso corporal) (LUCIO et al., 2000).

Os animais foram observados por períodos de 24 e 48 h (ABDEL-BARRY, 2000). Os parâmetros de toxicidade aguda foram monitorados através do registro do número de mortes de animais por grupo.

A avaliação ou *screening* hipocrático fornece uma estimativa geral da natureza toxicológica de uma substância desconhecida sobre: estado consciente e disposição (I), atividade e coordenação do sistema motor (II), reflexos (III), atividades sobre o sistema nervoso central (IV) e sistema nervoso autônomo (V) (MALONE; ROBICHAUD, 1983).

Nesse sentido, as avaliações do *screening* hipocrático foram realizadas 0, 24, 48 horas após administração, e os animais sobreviventes da determinação da DL50 foram pesados e observados a cada 24 horas até o 14º dia após os tratamentos, para verificação de possíveis efeitos tardios da substância. Os efeitos médios foram obtidos a partir dos dados anotados individualmente (ARAÚJO et al., 1994).

Todos os animais foram mantidos sem restrições alimentar e de ingestão de líquidos, com exceção de 16 horas antes da aplicação das doses, onde os animais foram colocados em jejum de ração, sendo recolocada após as aplicações. O animais foram climatizados a  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ , com ciclo claro/escuro natural, e em caixas de polipropileno adequadas a sua manutenção.

O teste de micronúcleos (MN) foi realizado conforme recomendações de Mavournin et al. (1990), e com algumas modificações propostas por Da Silva et al. (2009). Decorridas 24 horas da administração das concentrações de 5 mg/Kg, 50 mg/Kg e 500 mg/Kg, e do controle negativo, solução salina 0,9% (m/v), no volume de 10 ml/Kg de peso corporal, procedeu-se a extração das células da medula óssea dos

animais, através da lavagem dos dois fêmures, com 3 mL de soro bovino fetal. Foram realizados dois esfregaços por animal, confeccionados diretamente nas lâminas. Após 24 horas, as lâminas foram fixadas com metanol P. A. e coradas com Giemsa, por 10 minutos.

A análise do material foi realizada em fotomicroscópio óptico com aumento de 1000X com câmera digital acoplada de 12mp. As lâminas foram codificadas para análise em teste cego. Os critérios de identificação de micronúcleos seguiram os descritos por Sarto et al. (1987) e por Tolbert et al. (1991,1992), como estruturas que apresentam distribuição cromatínica e coloração igual (ou mais clara) do que a do núcleo, que estejam no mesmo plano que este, apresentem limites definidos e semelhantes aos nucleares e o seu tamanho não ultrapasse 1/3 do tamanho do núcleo. Foram computadas apenas células apresentando citoplasma íntegro.

Como anormalidade nuclear pertinente à citotoxicidade considerou-se a presença de células binucleadas (BN) de acordo com Holland et al. (2008). A incidência de MN e BN foi observada em 2000 EPC (eritrócitos policromáticos) (1000 em cada lâmina preparada por animal).

Para determinação da DL50 (dose letal mediana) foi anotado o número de animais mortos para cada uma das doses e a DL50 foi calculada por regressão linear. A interação entre o peso de machos e fêmeas foi realizada por uma análise fatorial.

A análise estatística dos pesos médios, quantidade de micronúcleos e células binucleadas foi realizada por comparação ao controle negativo através do método de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's ( $p < 0,05$ ), quando os dados estavam fora da normalidade segundo o teste de Shapiro-Wilk (ZAR, 1999), ou quando não, por ANOVA não paramétrica, com o teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software R, versão 3.2.0.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

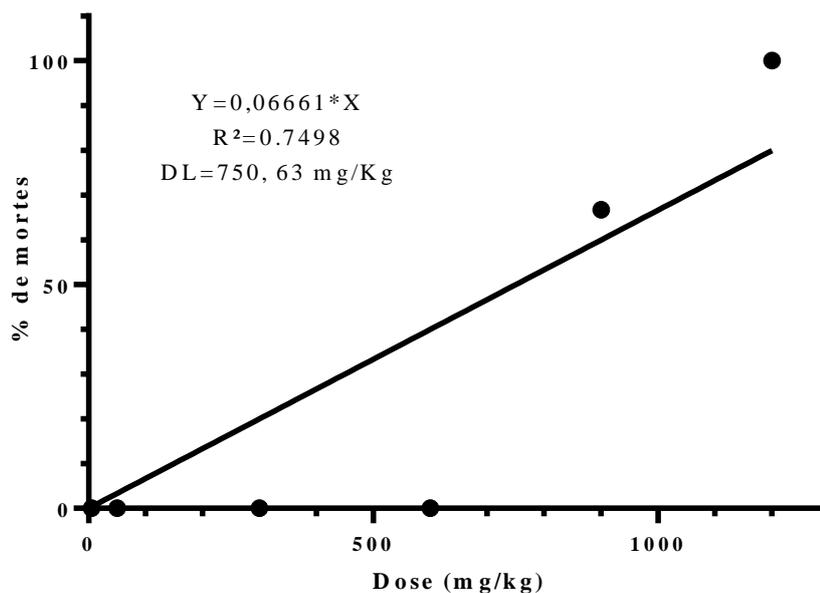
Durante a realização do ensaio de toxicidade aguda por via intraperitoneal foram observados e registrados o número de óbitos em cada grupo aplicados com concentrações crescentes do extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyriformium* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de mortes a partir da administração intraperitoneal em doses crescentes do extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium*.

Dose (mg/Kg)	n <sup>a</sup>	Mortes/Total
Controle	6	0/6
5	6	0/6
50	6	0/6
300	6	0/6
600	6	0/6
900	6	4/6
1200	6	6/6

na: número de animais utilizados em cada nível de dose.

Os resultados da toxicidade aguda revelaram uma dose letal mediana (DL50) de 750,63 mg/Kg para o extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium* (Figura 2). Sendo letal, nas concentrações testadas, a partir da concentração de 900 mg/Kg, com 66,7% dos animais mortos.



**Figura 1.** Dose letal mediana do extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium* administrados intraperitonealmente em camundongos. Regressão linear da dose-resposta: R² = 0,7498 e Y = 0,06661 \* X.

A avaliação de toxicidade aguda é uma metodologia amplamente empregada para verificar e classificar substâncias quanto à sua capacidade de provocar danos agudos aos organismos vivos, em altas doses, especialmente injúrias anatomopatológicas e letalidade, e podem oferecer contribuição para estabelecer

parâmetros de segurança juntamente com outros dados de toxicidade. Quanto aos vegetais, este método é útil para identificar a toxicidade que o mesmo possa apresentar (LAPA, 1999; LAPA, 2001; MARLIÉRE et. al., 2008; SILVEIRA et al., 2008; CUNHA et al., 2009).

Nóbrega (2008) avaliou a toxicidade aguda do extrato metanólico da casca de *Aspidosperma pyrifolium* também em camundongos e encontrou a maior dose que não apresentava letalidade como sendo 5 mg/Kg e a menor dose que apresentou 100% de letalidade foi 15,62 mg/Kg.

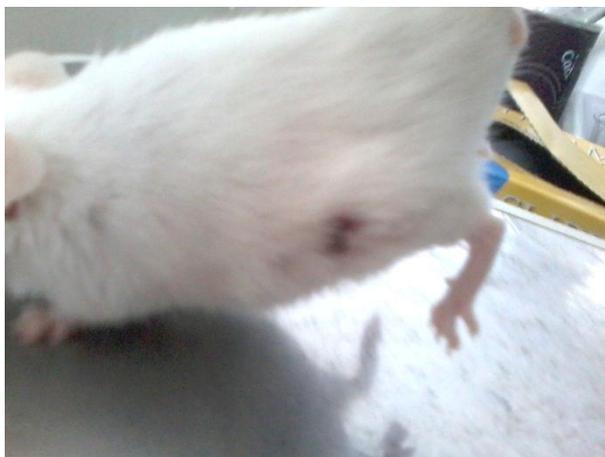
Compostos de metabolismo secundário, como compostos fenólicos e flavonoides, estão associados a efeitos tóxicos nos organismos (AGUIAR, 2004; AGUIAR et al, 2007; HUTABARAT et al., 2000). Grandes quantidades de taninos podem desempenhar atividades prejudiciais aos animais. Monteiro et al (2005) comenta que animais domésticos podem ser levados a morte se ingerirem alimentos com altos teores de taninos.

Nóbrega (2008) relata a presença de triterpenos, esteroides, iridóides, saponinas, açúcares redutores e ausência de glicosídeos cardíacos para *A. pyrifolium* Mart. Métodos fitoquímicos clássicos realizados por Santos (2010) em extratos botânicos para detecção de constituintes químicos revelam que o pereiro é detentor de alcaloides e taninos. Desse modo, a toxicidade do extrato aquoso de folhas frescas deve estar associada a presença desses compostos orgânicos.

Na análise do “*Screening* Hipocrático” para as concentrações de 5 mg/Kg, 50 mg/Kg, 300 mg/Kg e 600 mg/Kg nas primeiras 48 h, de forma geral, foram observadas um aumento do estado de consciência e disposição (atividade geral); um aumento da atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular (resposta ao toque); um aumento do sistema nervoso central (tremores), e do sistema nervoso autônomo (respiração). Tais manifestações foram reversíveis desaparecendo após as primeiras 48 h.

Na concentração de 900 mg/Kg, nas primeiras 48 h, houve uma diminuição do estado de consciência e disposição (atividade geral); uma diminuição da atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular (resposta ao toque; endireitamento e tônus do corpo); um aumento do sistema nervoso central (tremores; convulsões e straub), e de diminuição do sistema nervoso autônomo (respiração). Quatro

camundongos (de seis) já morreram nos primeiros 30 minutos. Dos dois animais que sobreviveram após as 48 horas as manifestações desapareceram, contudo, um dos animais demonstrou algumas feridas no corpo a partir do 7º dia (Figura 2).



**Figura 2.** Camundongo sob efeito da concentração de 900 mg/Kg do extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium* apresentando feridas no corpo a partir do 7º dia do screening hipocrático. Foto: Edigleyce Costa.

Na concentração de 1200 mg/kg todos os animais morreram nos primeiros 30 minutos depois de injetada a concentração, apresentando sinais de grande diminuição do estado de consciência e disposição (atividade geral), diminuição da atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular (resposta ao toque; endireitamento, força para agarrar e tônus do corpo); um grande aumento do sistema nervoso central (tremores; convulsões e straub), e de diminuição do sistema nervoso autônomo (respiração).

Esses dados podem ser comparados com o screening realizado por Nóbrega (2008), que aplicou diferentes concentrações do extrato metanólico da casca de *A. pyrifolium*, de modo que os animais apresentaram após 30 minutos da administração, reações com características estimulantes tais como: agitação, movimentos circulares, reações de fuga, tremores grosseiros, movimentos de vibrissas e taquicardia. Em seguida os animais passaram a apresentar reações com características depressoras como: ambulação diminuída, flacidez muscular e analgesia (diminuição dos reflexos), outros efeitos observados foram: contorções abdominais, tônus da musculatura abdominal, espasmos e irritação na conjuntiva.

Observa-se que a influência dessa planta sobre o sistema nervoso dos animais, o que está de acordo com o conhecimento popular dos produtores sobre a toxicidade da mesma quando consumida por bovinos, caprinos e ovinos, com efeitos no sistema reprodutivo e nervoso, principalmente quando os animais consomem a planta verde (MEDEIROS et al., 2004; SILVA et al., 2006; ASSIS et al., 2009; RIET-CORREA et al., 2011; RIET-CORREA; MEDEIROS, 2011; NETO et al., 2013; FERREIRA, 2014).

Dando continuidade as análises, os animais foram monitorados do primeiro ao 14º dia após os tratamentos instituídos para avaliação do parâmetro fisiológico peso corporal.

**Tabela 2.** Peso médio (g)  $\pm$  desvio padrão das fêmeas, dos machos e do total de animais (machos + fêmeas) que receberam o extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium*. Foi empregado o método de Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey.

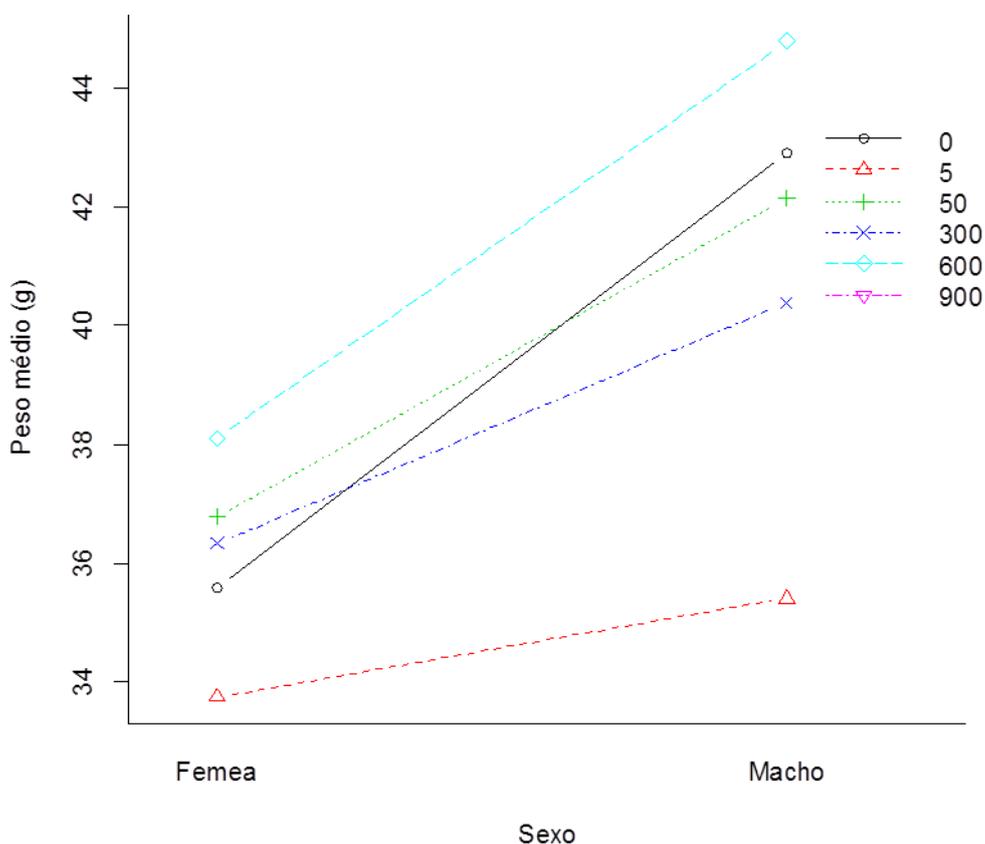
Concentração	Peso médio					
	Fêmeas	npf	Machos	npm	Total	npt
Controle	35,58 $\pm$ 0,98	3	42,89 $\pm$ 0,88	3	39,24 $\pm$ 1,35	6
5 mg/Kg	33,74 $\pm$ 4,08 <sup>ns</sup>	3	34,49 $\pm$ 3,31 <sup>ns</sup>	3	35,84 $\pm$ 1,50 <sup>ns</sup>	6
50 mg/Kg	36,77 $\pm$ 1,27 <sup>ns</sup>	3	42,14 $\pm$ 4,35 <sup>ns</sup>	3	40,22 $\pm$ 1,85 <sup>ns</sup>	6
300 mg/Kg	36,32 $\pm$ 2,57 <sup>ns</sup>	3	40,38 $\pm$ 1,24 <sup>ns</sup>	3	38,62 $\pm$ 2,00 <sup>a</sup>	6
600 mg/Kg	38,10 $\pm$ 4,27 <sup>ns</sup>	3	44,77 $\pm$ 4,90 <sup>ns</sup>	3	41,44 $\pm$ 1,78 <sup>b</sup>	6
900 mg/Kg	ND	0	46,78 $\pm$ 3,94 <sup>ns</sup>	2	46,78 $\pm$ 1,76 <sup>ns</sup>	2
1200 mg/Kg	ND	0	ND	0	ND	0

ND = Não determinado, ns ( $p > 0,05$ ) valores não significativos, npf é o número de fêmeas pesados, npm é o número de machos pesados e npt é o número total incluindo machos e fêmeas pesados. Colunas seguidas por letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas com valores maiores do que o controle.

Observando o peso dos gêneros nas concentrações testadas, as fêmeas sobreviventes, aparentemente, obtiveram um ganho de peso proporcional ao aumento das concentrações, no entanto, esse aumento não foi estatisticamente significativo. Os machos sobreviventes não apresentaram variação de peso estatisticamente significativa entre as concentrações. Quando analisando o peso médio total observa-se um aumento significativo do peso comparando a concentração de 5 mg/Kg com 600 mg/Kg e de 5 mg/Kg com 900 mg/Kg. Apesar desta última concentração já se encontrar no intervalo de letalidade do extrato, ela não foi capaz de reduzir o peso dos animais (Tabela 2). Os pesos não determinados ocorreram devido a morte dos animais.

As alterações no peso médio têm sido usadas como indicador de efeitos adversos para drogas e compostos (HILALY et al., 2004). Um estudo realizado com o pó das cascas do tronco de *Aspidosperma excelsum* na dose de 5000 mg/kg também não alterou a evolução ponderal do peso de ambos os sexos em relação aos respectivos grupos controle em camundongos.

Também foi realizada uma comparação entre o peso dos machos e das fêmeas, onde foi observado que não houve interação em nenhuma das concentrações testadas entre fêmeas e machos, mostrando que o peso de um sexo não influenciou no peso do outro sexo (Figura 3).



**Figura 3.** Análise fatorial da interação entre o peso médio das fêmeas e machos nas concentrações do controle (0 mg/L), 5 mg/Kg, 50 mg/Kg, 300 mg/Kg, 600 mg/Kg e 900 mg/Kg.

Outro parâmetro analisado foi a quantidade de micronúcleos nas células de medula óssea de camundongos (Tabela 3). As características mais importantes da análise pelo teste de micronúcleos são a rapidez e a facilidade pela qual a atividade

genética pode ser demonstrada *in vivo* e o conhecimento de que, esses eventos, sendo de natureza cromossômica, são muito significativos em termos de riscos para os animais e seres humanos (SALAMONE et al., 1980; MAVOURNIN et al., 1990).

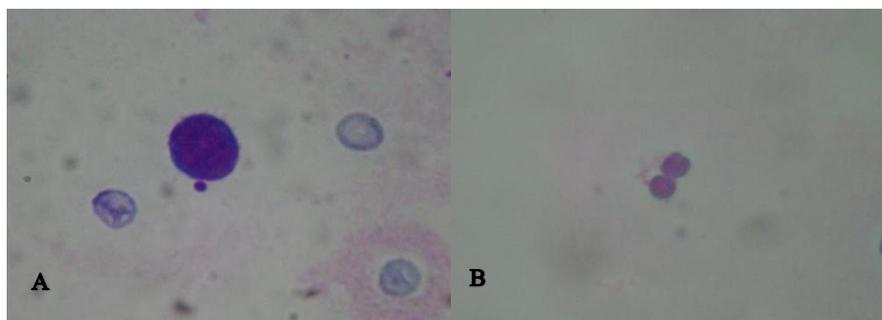
Na análise das médias das frequências de micronúcleos e células binucleadas as concentrações testadas não apresentaram nem potencial mutagênico e nem citotóxico, quando comparadas ao controle (Tabela 3).

**Tabela 3.** Micronúcleos e células binucleadas (média  $\pm$  desvio padrão) em células de medula óssea de camundongos, após 24 horas da administração intraperitoneal do extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium*. Método de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's.

Concentração	Total de células	MN $\pm$ SD	BN $\pm$ SD
Controle	6000	90 $\pm$ 6,07	49,5 $\pm$ 37,33
5 mg/Kg	6000	120 $\pm$ 4,63 <sup>ns</sup>	43,25 $\pm$ 38,29 <sup>ns</sup>
50 mg/Kg	6000	93 $\pm$ 9,29 <sup>ns</sup>	46,08 $\pm$ 48,53 <sup>ns</sup>
500 mg/Kg	6000	82 $\pm$ 3,33 <sup>ns</sup>	58,41 $\pm$ 53,77 <sup>ns</sup>

MN – micronúcleos, SD – desvio padrão, BN – binucleadas \* (p<0,05) diferença significativa entre as concentrações e o controle. ns (p>0,05) valores não significativos

As imagens dos micronúcleos e células binucleadas referidas nos resultados estão apresentadas na Figura 4.



**Figura 4.** Fotomicrografias (aumento de 1000 x) de MN (A) e células BN (B) encontradas em medula óssea de camundongos após 24 h de administração intraperitoneal do extrato aquoso de folhas frescas de *Aspidosperma pyrifolium*. Fonte: Edigleyce Costa.

Os micronúcleos são marcadores da exposição humana a genotóxicos e têm sido extensivamente, usados para identificar agentes mutagênicos. Sua incidência pode indicar instabilidade cromossomal e sua alta frequência ocorre em células tumorais e em células com defeitos em reparo de DNA ou disrupção do checkpoint no ciclo celular. Recentemente, evidências acumuladas sugerem indução de parada no ciclo celular ocasionando a indução de apoptose (TERRADAS et al., 2010).

Quanto às células binucleadas, estas são indicativas de citotoxicidade decorrentes numa falha no processo de citocinese (HOLLAND et al. 2008). O aumento na sua incidência pode prever uma falha no mecanismo de diferenciação celular ou ser secundária a agentes genotóxicos. Os processos subjacentes ao aparecimento dessas anormalidades não são ainda totalmente compreendidos. Porém, existe um grande número de publicações que se referem aos mesmos (OZKUL et al., 1997; GONSEBATT et al.,1997; BURGAZ et al., 1999; REVAZOVA et al.,2001; CELIK et al., 2003; BASU et al.,2002; CARVALHO et al., 2002).

#### **4. CONCLUSÕES**

A espécie *Aspidosperma pyrifolium*, nas concentrações testadas, mostrou-se letal nas fêmeas e machos a partir da concentração de 900 mg/Kg, observando a quantidade de mortes, obtendo, assim, uma dose letal mediana de 750,63 mg/Kg com o extrato aquoso de folhas frescas.

Os animais avaliados apresentaram alterações comportamentais, principalmente nas primeiras 48 horas, de modo que a planta mostrou influência no sistema nervoso dos animais. Já as alterações de peso médio para os sexos não foi significativa. Contudo, houve diferença significativa do peso médio total entre as concentrações de 5 mg/Kg e 600 mg/Kg e 5 mg/Kg e 900 mg/Kg.

As concentrações testadas não mostraram potencial mutagênico e citotóxico, quando na análise das frequências de micronúcleo e células binucleadas por concentração.

Novos estudos devem ser realizados visando obter mais dados de toxicidade dessa planta para assegurar o uso em saúde humana e animal. No entanto, este trabalho fornece dados de análise experimental de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade com células da medula óssea de camundongos ainda não investigados para *Aspidosperma pyrifolium*.

## 5. REFERÊNCIAS

ABDEL-BARRY, J.A.; AL-HAKIEM, M.H.H. Acute intraperitoneal and oral toxicity of the leaf glycosidic extract of *Trigonella foenum-graecum* in mice. **Journals Ethnopharmacology**, v.70, p. 65-8. 2000.

AGUIAR, C. L. **Transformações física e bioquímica de isoflavonóides conjugados de soja (*Glycine max* L.) e o efeito na atividade biológica *in vitro***. 2004. 285 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas. 2004.

AGUIAR, C. L., et al. Analysis de isoflavonoids from Leguminous plant extracts by RPHPLC/DAD and electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 58, p.116-24, 2007

ARAÚJO, L.C.L. et al. Avaliação toxicological aguda e screening hipocrático da *Anchietae salutaris* St. Hill.- *Violaceae*. **Lecta-USF**, v.12, n.1, p. 7-21, 1994.

ASSIS, T. S., et al., Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 919-924. 2009.

AZEVEDO, L. et al. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1671-1671, 2003.

BARBOSA, D. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae)**. 2008. 64f. Dissertação (mestrado).Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

BARROS, S. B.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J.A. O. (Org.). **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-68.

BASU, A. et al. Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India, **Mutation Research**, v.516, p.29–40, 2002.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity. **ILAR JOURNAL**, v. 43, Suppl:S, p. 277-281, 2003.

BURGAZ, S. et al. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics, **Mutation Research**, v.439, p. 97–104, 1999.

CARVALHO, M. B. et al. Relationship between the outcome and the frequency of micronuclei in cells of patients with oral and oropharyngeal carcinoma, **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, p. 317–322, 2002.

CELIK, A. et al. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis** v.18, p. 417-421, 2003.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: IBDF, 1978. v.5, 687p.

CUNHA, L. C., et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2A, p.403-11, 2009.

DA SILVA, L.B., BORTOLI, M. G., AZEVEDO, M. B. . Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. **Mutation Research**, v. 675, 2009.

FERREIRA, F. W. S. **Levantamento da vegetação da caatinga utilizada na alimentação animal no Oeste Potiguar**. 2014. 64f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró. 2014.

GONSEBATT, M. E. et al. Micronucleus (MN) frequency in nasal respiratory epithelium from young adults living in urban areas with different levels of air pollution, **Mutation Research**, v.379, p.198, 1997.

HILALY, J.E.; ISRAILI, Z.H.; LYOUSSI, B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 91, p. 43-50, 2004.

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for bio-monitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research**, v. 659, p. 93-108, 2008.

HUTABARAT, L. S.; GREENFIELD, H.; MULHOLLAND, M. Quantitative determination of isoflavones and coumestrol in soybean by column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 886, p. 55-63. 2000.

JACOME, R. L. R. P. et al. Chemical constituents and chromatographic profile of the stem bark of *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (“pau-pereira”). **Química Nova**, v. 27, n.6, p. 897-900, 2004

LAPA, A. J. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. (Ed). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina; 1999, p. 181-96.

LAPA, A. J., et al. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Salvador: Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE); 2001.

LOPES, S.G. **Fundamento da Toxicologia Clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

LUCIO, E. M. R. A et al. Avaliação toxicológica aguda e creening hipocrático da epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9, n. 10, p. 23-25, 2000.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. The Pharmacological Evaluation of Natural Products – General and Specific Approaches to Screening Ethnopharmaceuticals. **Journals Ethnopharmacology**, v. 8, p.127-147, 1983.

MARLIÉRE, L.D.P. et al. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18(Supl.), p.754-60, 2008.

MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, **Biochimie**, v. 88, p. 1515–1531, 2006.

MAVOURNIN, K. H, et al. The *in vivo* Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 239, p. 29-80, 1990.

MEDEIROS, R. M. T., et al. Mortalidade embrionária e abortos em caprinos causados por *Aspidosperma pyriforme*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, p. 42-43. 2004

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

NETO, S. A. G.; SAKAMOTO, S. M.; SOTO-BLANCO, B. Inquérito epidemiológico sobre plantas tóxicas das mesoregiões Central e Oeste do Rio Grande do Norte. **Ciência Rural**, v. 43, n.7, p. 1281-1287, 2013.

NÓBREGA, M. G. L. A. **Perfil fitoquímico e farmacológico da *Aspidosperma pyriforme* Mart. “Ensaios pré-clínicos”**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2008.

Organisation For Economic Cooperation and Development - OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2001.

OZKUL, Y., et al. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users, **Mutagenesis** v.12, p.285–287, 1997.

REVAZOVA, J., et al. Cytogenetic investigation of women exposed to different levels of dioxins in Chapaevsk town, **Chemosphere** v.43, p.999–1004, 2001.

REZENDE, O.S.J.; LIMA, E.B.; MAISTRO, L.C. **Intoxicações por plantas tóxicas notificadas no CIT – Centro de Informação Toxicológica de Goiás no período de 2001 a 2005**. 2006. 72f. Monografia (Especialização) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

RIET-CORREA, F.; BEZERRA, C. W. C.; MEDEIROS, R. M. T. **Plantas tóxicas do Nordeste**. Sociedade Vicente Pallotti Editora. Universidade Federal de Campina Grande, Patos – PB. 2011. 79 p.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.1, p. 38-42. 2011.

SALAMONE, M et al. Towards an improved micronucleus test: studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 74, p. 347-356. 1980.

SALLES, H. O. **Papel da lectina de folhas de *Ipomoea asarifolia* R. et Schult na toxicidade a animais e seu envolvimento no mecanismo de defesa da planta**. 2008. 129 p. Tese de doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

SANTOS, P. B. S. **Contribuição ao estudo químico, bromatológico e atividade biológica de Angico *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Var. Cebil (Gris.) Alts E PEREIRO *Aspidosperma pyrifolium* Mart.** 2010. 46 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia: Área de Concentração em Sistemas Agrossilvipastoris no Semiárido. Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2010.

SARTO, F. et al. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, v. 2, p.11–17, 1987

SILVA, D. M. et al. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n. 4, p. 223-236, 2006.

SILVEIRA, P. F; BANDEIRA, M. A. M; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.18, p. 618-26, 2008.

TERRADAS, M.M., et al. DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response, DNA Repair. **Amsterdam**. v.8, p.1225–1234, 2010.

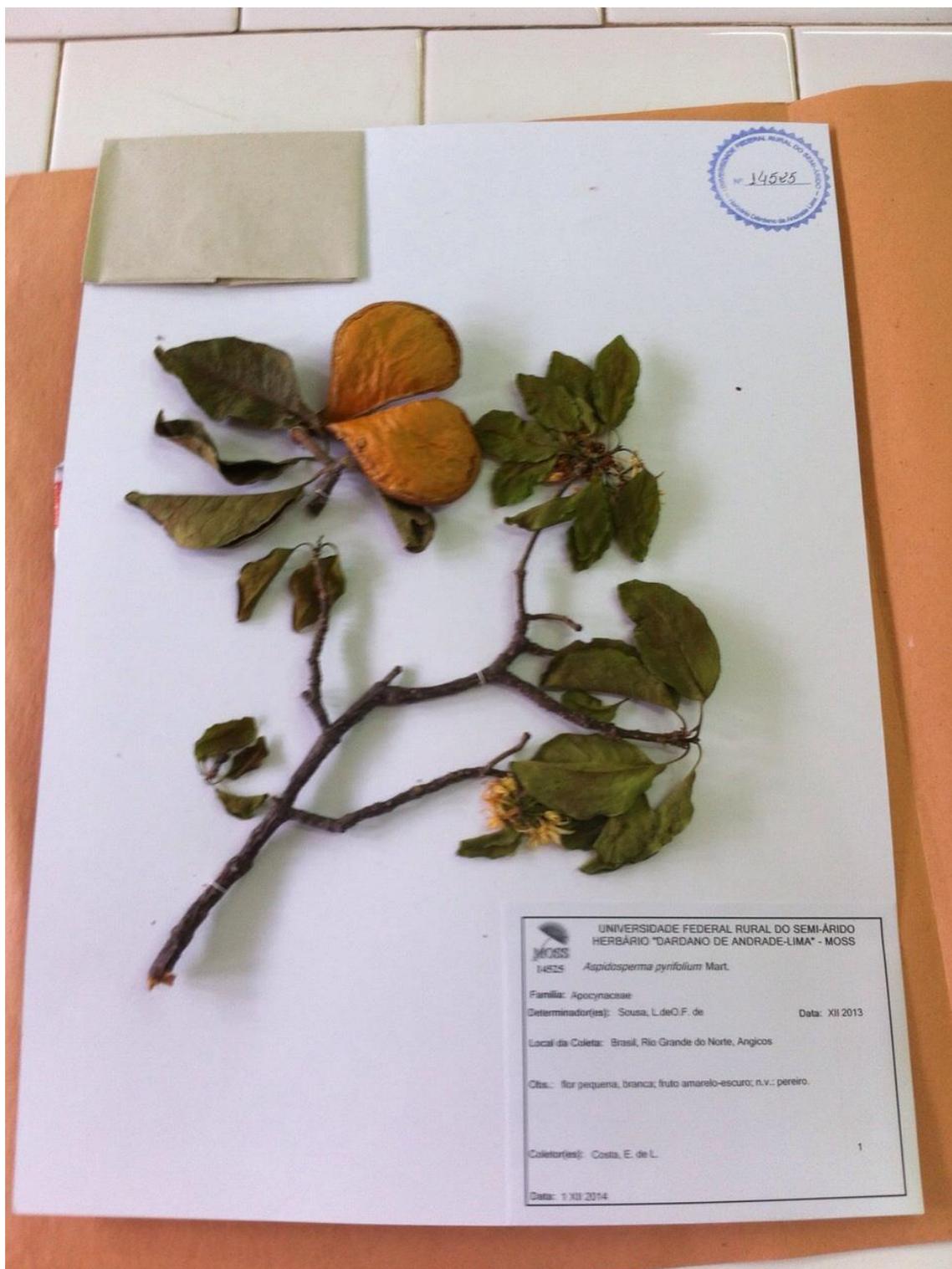
TOLBERT, P.E. et al. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **American Journal of Epidemiology**, v.134, p. 840-850, 1991.

TOLBERT, P.E. et al. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, v. 271, p. 669–677, 1992.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**, 4th edn. Prentice Hall, Upper Saddle River. 1999.

## 6. ANEXOS

ANEXO A - Identificação das exsicatas da espécie *Aspidosperma Pyrifolium* depositadas no herbário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).



**ANEXO B - Parecer de projeto encaminhado a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**PARECER DE PROJETO ENCAMINHADO A CEUA-UFERSA**

**Parecer N° 27/2014 PROCESSO N° 23091.003280/2014-45**

**Data de Entrada: 13/08/2014      Aprovado: 04/11/2014**

**1. Responsável:**

*Marcos antonio Nobrega de Sousa*

**2. Título do Projeto**

*Avaliação citotóxica, genotóxica e mutagênica de extratos de plantas em organismos bioindicadores*

**Considerações:**

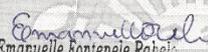
*Após apreciação pelos membros, a comissão julgou que o projeto encontra-se dentro das especificações exigidas pela CEUA e conforme a legislação vigente em relação ao bem-estar animal. O procedimento de eutanásia dos animais está de acordo com a resolução N° 1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, o qual dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Todo o procedimento de manipulação do material será realizado com acompanhamento técnico especializado e com o uso de material adequado.*

**3. Parecer final:**

**FAVORÁVEL** à aprovação do projeto

*Mossoró, 12 de novembro de 2014.*

*Atenciosamente,*

  
Profª Emanuelle Fontenele Rabelo  
Presidente  
Comissão de Ética no uso de animais  
CEUA/UFERSA

**Emanuelle Fontenele Rabelo**  
**Presidente CEUA**